



**TECHNISCHE UNIVERSITÄT
CAROLO-WILHELMINA
ZU BRAUNSCHWEIG**

Chip-basierte Systeme zum Nachweis von RNA- und DNA-Viren

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
Dissertation

von Katharina Hild
aus Berlin-Pankow

1. Referent:	Professor Dr. Stefan Dübel
2. Referent:	Professor Dr. Michael Steinert
eingereicht am:	14.07.2010
mündliche Prüfung (Disputation) am:	02.11.2010

Druckjahr 2010

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Zwischenbericht zum Studienauftrag E/E590/6Z027/3F071: „Automatisierte Schnellnachweise für B-Agenzien auf Biochipbasis – DNA- und Immunoarrays für das AP[®]-System“ (April 2008)

Abschlussbericht zum Studienauftrag E/E590/6Z027/3F071: „Automatisierte Schnellnachweise für B-Agenzien auf Biochipbasis – DNA- und Immunoarrays für das AP[®]-System“ (Juli 2009)

Tagungsbeiträge

Hülseweh B., Voß L., Langermann C., Hild K. and Marschall H.-J.: Protein- and DNA-chips for the automated and simultaneous detection of BW-agents. (Poster) Medizinische B-Schutztagung; Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München (Oktober 2007)

Hülseweh B., Hild K., Marschall H.-J.: DNA-Arrays zur automatisierten und parallelen Detektion von B-Agenzien. (Poster) Planungskonferenz Wehrwissenschaftliches Institut für Schutztechnologien – ABC-Schutz, Munster (März 2009)

Hülseweh B., Hild K., Marschall H.-J.: Antikörper-Arrays zur vereinfachten und parallelen Detektion von B-Agenzien. (Poster) Planungskonferenz Wehrwissenschaftliches Institut für Schutztechnologien – ABC-Schutz, Munster (März 2009)

Hülseweh B., Hild K., Marschall H.-J.: Nukleinsäure-Arrays zur parallelen Detektion von B-relevanten Viren. (Poster) Planungskonferenz Wehrwissenschaftliches Institut für Schutztechnologien – ABC-Schutz, Munster (März 2010)

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS UND GLOSSAR.....	4
3	EINLEITUNG	7
3.1	ARBOVIREN	7
3.1.1	Arboviren Gruppe A – Alphaviren	8
3.1.1.1	Morphologie.....	9
3.1.1.2	Das virale Genom.....	9
3.1.1.3	Das Venezuelanische Pferdeenzephalitis-Virus	11
3.1.1.3.1	Serologische Subtypen des VEE-Virus	11
3.1.2	Arboviren Gruppe B – Flaviviren.....	13
3.1.2.1	Morphologie.....	13
3.1.2.2	Das virale Genom.....	14
3.2	POCKENVIREN	15
3.2.1	Morphologie	16
3.2.2	Das virale Genom	17
3.3	BIOLOGISCHE WAFFEN	18
3.4	MICROARRAYS	20
3.4.1	Entwicklung der Microarray-Technologie	21
3.4.2	Anwendungsbereiche von Microarrays	22
3.4.3	Spotting und Prozessierung von Microarrays.....	24
3.4.4	Leistungsfähigkeit von Microarrays	26
3.5	ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	27
4	MATERIAL UND METHODEN	28
4.1	MATERIALIEN.....	28
4.1.1	Geräte	28
4.1.2	Chemikalien	30
4.1.3	Kits	31
4.1.4	Verbrauchsmittel	32
4.1.5	Lösungen und Puffer	33
4.1.6	Antikörper.....	35
4.1.7	Primer und TaqMan-Sonden für die RT-PCR bzw. PCR	37
4.1.8	Hybridisierungssonden für die DNA-Arrays	38
4.1.9	Das Approve-B® System.....	41
4.1.9.1	Aufbau der AP®-Kartusche.....	41
4.1.9.2	Spotting der Biochips für die AP®-Kartuschen	43
4.1.9.3	Die Approve-B® Prozessierungs- und Detektionseinheit.....	43
4.1.9.4	Die Approve-B® Auswertesoftware PocLab2	44
4.2	METHODEN.....	45
4.2.1	Zellbiologische Methoden	45
4.2.1.1	Verwendete Zelllinien.....	45
4.2.1.2	Passagieren von Zelllinien	45
4.2.1.3	Hybridoma-Zellkultur	46
4.2.2	Virologische Methoden	47
4.2.2.1	Verwendete Virusstämme	47
4.2.2.2	Virusanzucht und -ernte	48
4.2.2.3	Titerbestimmung nach Spearman und Kärber	48
4.2.2.4	Inaktivierung von Viren.....	49
4.2.2.4.1	Virusinaktivierung mit β -Propiolakton	49
4.2.2.4.2	Virusinaktivierung mit β -Ethylenimin	49
4.2.2.4.3	Überprüfung der Virusinaktivierung	50

4.2.3	Immunologische Methoden.....	51
4.2.3.1	Aufreinigung von in Hybridoma-Zellkultur produzierten Antikörpern über eine GAM-Säule	51
4.2.3.2	Proteinbestimmung	51
4.2.3.3	Biotinylierung und Fluoreszenz-Labeling der Antikörper	51
4.2.3.4	ELISA	53
4.2.3.5	Immunologischer Virusnachweis im AP [®] -System.....	55
4.2.3.5.1	Prinzip der immunologischen Detektion von Viren im AP [®] -System	55
4.2.3.5.2	Versuchsdurchführung	56
4.2.4	Molekularbiologische Methoden	57
4.2.4.1	Polymerase-Kettenreaktion	57
4.2.4.2	Reverse Transkription PCR	57
4.2.4.3	real-time (RT)-PCR	58
4.2.4.4	Agarose-Gelelektrophorese	58
4.2.4.5	Molekularbiologischer Virusnachweis mittels AP [®] -System	59
4.2.4.5.1	Prinzip der molekularbiologischen Detektion von DNA- und RNA-Viren im AP-System	59
4.2.4.5.2	Sondenkonzipierung	61
4.2.4.5.3	Versuchsdurchführung	62
4.2.5	Elektronenoptische Methoden	63
4.2.5.1	Elektronenmikroskopie	63
4.2.5.1.1	Probenpräparation	64
4.2.5.1.2	Vorbereitung der Proben für die Elektronenmikroskopie	64
5	ERGEBNISSE	65
5.1	IMMUNOLOGISCHER ANTIGEN-NACHWEIS MIT DEM AP[®]-SYSTEM	65
5.1.1	Optimierung des immunologischen Antigen-Nachweises	65
5.1.2	Untersuchung der Antigenbindung auf dem AP [®] -Biochip	67
5.1.3	Immunologischen Einzelnachweis für Viren, Bakterien und Toxine mit dem AP [®] -System	71
5.1.3.1	Etablierung eines Alphavirus-Nachweises.....	71
5.1.3.2	Etablierung eines Vaccinia-Virus-Nachweises.....	73
5.1.3.3	Flaviviren	74
5.1.3.4	Positivkontrolle <i>E.coli</i>	74
5.1.3.5	Toxinnachweis – Ricin	75
5.1.4	Immunologische Multiplex-Versuche mit dem AP [®] -System	76
5.2	MOLEKULARBIOLOGISCHER VIRUSNACHWEIS MIT DEM AP[®]-SYSTEM	78
5.2.1	Sondenkonzipierung für das AP [®] -System	78
5.2.2	Optimierung der Magnesiumchlorid- und Primerkonzentration in der RT-PCR bzw. PCR	83
5.2.3	Austesten verschiedener RT-PCR- und PCR-Kits	86
5.2.4	Optimierung des molekularbiologischen Virusnachweises im AP [®] -System	86
5.2.4.1	Einfluss der Salzkonzentration auf die Hybridisierung.....	86
5.2.4.2	Einfluss der Enzymkonzentration auf die Produktausbeute in der RT-PCR	89
5.2.4.3	Einfluss der Primerkonzentrationen auf die Signalintensität	89
5.2.4.4	Einfluss der Extensionstemperatur in der PCR auf die Intensität der Hybridisierungssignale	90
5.2.4.5	Einfluss der Prozessierungszeit in der RT-PCR und in der Hybridisierung auf die Signalintensität.....	92
5.2.4.5.1	Extensionszeit.....	92

5.2.4.5.2	Zykluszahl.....	92
5.2.4.5.3	Denaturierungszeit vor der Hybridisierung	93
5.2.4.5.4	Hybridisierungszeit	93
5.2.4.6	Kombination der vier Schritte zur Zeitersparnis	94
5.2.4.7	Optimierung der auf dem Biochip immobilisierten Hybridisierungssonden.....	96
5.2.4.8	Bestimmung der Nachweisgrenzen im Einzelnachweis für Alpha-, Flavi- und Orthopockenviren	102
5.2.4.9	Molekularbiologische Differenzierung von VEEV- Stämmen durch AP [®] -Analyse	109
5.2.4.10	Etablierung von Duplex- und Triplexnachweisen.....	111
5.2.4.10.1	Molekularbiologische Duplexnachweise im AP [®] -System	111
5.2.4.10.2	Molekularbiologische Triplexnachweise im AP [®] -System	114
5.2.4.11	Intra- und Interassay-spezifische Variabilität im molekularbiologischen AP [®] -Nachweis	118
6	DISKUSSION.....	120
6.1	IMMUNOLOGISCHER ANTIGEN-NACHWEIS IM AP[®]-SYSTEM	120
6.2	MOLEKULARBIOLOGISCHER VIRUSNACHWEIS IM AP[®]-SYSTEM	125
6.3	VOR- UND NACHTEILE DES IMMUNOLOGISCHEN UND MOLEKULARBIOLOGISCHEN NACHWEISES IM AP[®]-SYSTEM.....	130
6.4	VORSCHLAG EINES BIOCHIP-LAYOUTS ZUR IMMUNOLOGISCHEN BZW. MOLEKULARBIOLOGISCHEN IDENTIFIKATION VON BWA-RELEVANTEN VIREN.....	133
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	135
8	ANHANG	149
8.1	ARRAY-LAYOUTS.....	149
8.1.1	Protein-Arrays	149
8.1.2	DNA-Arrays.....	152
8.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	156
8.3	TABELLENVERZEICHNIS.....	158
8.4	DANKSAGUNG	159

1 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden immunologische und molekularbiologische Biochip-Nachweise für Viren, welche als potentielle biologische Waffen angesehen werden, aufgebaut, getestet und optimiert. Für die Prozessierung und Auslesung der Arrays konnte dabei gerätetechnisch auf das bereits existierende AP[®]-System der Firma Zenteris GmbH zurückgegriffen werden.

Die Besonderheit des benutzten Systems besteht in der Tatsache, dass die gesamte Nachweis-Reaktion in einer Kartusche mit integriertem Biochip unterbrechungsfrei abläuft und dass die Kartusche – je nach immobilisiertem Fängerset – sowohl für die immunologische als auch molekularbiologische Identifikation von Viren genutzt werden kann.

Für die immunologische als auch für die molekularbiologische Virus-Identifikation wurden die Reaktionsbedingungen für jeden Einzelnachweis ausgetestet und an das Biochip-System optimiert und angepasst.

Der immunologische Nachweis auf Basis eines klassischen Sandwich-ELISAs von Alpha- und Orthopockenviren gelang innerhalb von 30 Minuten mit Nachweisgrenzen pro Kartusche von 5×10^2 KID₅₀ für das Vaccinia-Virus und von 2×10^5 KID₅₀ für das Venezuelanische Pferdeenzephalitis-Virus.

Ein spezifischer molekularbiologischer Nachweis konnte für die Gruppe der Alpha-, Flavi- und Orthopockenviren etabliert werden. Der Zeitbedarf für diese Identifikation betrug anderthalb bis zwei Stunden. Die Titrations der einzelnen Viren ergaben abhängig vom nachzuweisenden Genabschnitt Nachweisgrenzen im Bereich zwischen 10^1 und 10^2 Genomkopien pro Ansatz.

Anders als in anderen Biochip-Systemen erfolgt der molekularbiologische Nachweis in dem hier vorgestellten System als direkte Kombination von Nukleinsäureamplifikation und Hybridisierung an die spezifischen Fängersonden. Für diesen unterbrechungsfreien Reaktionsablauf wurde einerseits die Enzym-, Magnesiumchlorid- und Primerkonzentration im Reaktionsmix und andererseits die Temperatur- und Zeitparameter der Prozessierungsbedingungen optimiert. Zusätzlich erfolgte die Weiterentwicklung und Verbesserung der Oligonukleotidsonden für eine sensitive und spezifische Identifizierung verschiedener Virusstämme einer Virusgattung. Für alle untersuchten Alpha-, Flavi- und Orthopockenviren konnten spezifische, signalintensive Nachweise für das Biochip-Format etabliert werden. Ein Parallelnachweis von bis zu drei verschiedenen Viren ist zeitgleich auf dem Biochip mit ausreichenden Sensitivitäten möglich.

Kritisch betrachtet werden muss, dass sowohl die immunologischen als auch molekularbiologischen Nachweise von mikrobiellen Agenzien im AP[®]-System für den Routineeinsatz umfangreichen Optimierungen bedürfen.

Verbesserungsmöglichkeiten für das AP[®]-System ergeben sich in einer baulichen Veränderung der Kartuschenkonstruktion. Der Einbau eines Dorns würde im immunologischen Nachweis eine nacheinander folgende Injektion von Antigen und Nachweis-Antikörper bzw. bei der molekularbiologischen Identifizierung eine Injektion von hybridisierungsfördernden Salzen vor der Hybridisierung erlauben und somit die Signalintensität und Spezifität weiter verbessern und stabilisieren.

Summary

Within the scope of the present PhD thesis we established, tested and optimized immunological and molecular biochip assays for viruses, which were regarded as prospective biological warfare agents. The already existing AP[®] system developed by the company Zenteris GmbH was used for the processing and readout of the arrays.

The specific characteristic of the used system consists in the fact that the whole detection reaction proceeds without interruption inside a cartridge with an integrated biochip. The cartridge can be deployed – depending on the immobilized capture set – either for the immunological or molecular identification of viruses.

We tested, optimized and adjusted the reaction conditions to the biochip-system for each virological assay.

The immunological analysis of alpha- and orthopoxviruses on the basis of a classical sandwich ELISA succeeded within 30 minutes and resulted in detection limits of 5×10^2 TCID₅₀ for Vaccinia virus and of 2×10^5 TCID₅₀ for Venezuelan equine encephalitis virus per cartridge.

A specific molecular analysis could be established for the genera of alpha-, flavi- and orthopoxviruses. The assay for the viral identification required one and a half to two hours. The titrations of the individual viruses resulted in detection limits between 10^1 to 10^2 genome copies per cartridge dependent on the analyzed gene sequence.

In comparison to other biochip-systems the molecular identification proceeds inside the introduced AP[®] system as a direct combination of nucleic acid amplification and hybridization to specific capture probes. For this non-interruptable reaction process the enzyme-, magnesium chloride- and the primer-concentration of the reaction mix as well as the temperature and time parameters of the processing conditions were optimized. Additionally, the oligonucleotide probes were refined and improved for a sensitive and specific identification of several viral strains of one virus genus. Specific and signal-intensive assays for the biochip format could be established for the examined alpha-, flavi and orthopoxviruses. The parallel detection of up to three viruses on the biochip is simultaneously feasible with adequate sensitivities.

It has to be considered critically that the immunological as well as the molecular analysis of microbial agents in the AP[®] system require substantial optimization for routine application.

The AP[®] system could be further improved by modifications of the cartridge design. For example the integration of a spike would allow the successively injection of antigen and detection antibody for the immunological analysis and would therefore minimize the cross reactivity of antibodies. Furthermore, the injection of hybridization supporting salts prior to the hybridization after the PCR is finalized would enhance and stabilize the signal intensity and specificity of the molecular detection assays.

2 Abkürzungsverzeichnis und Glossar

A. dest	destilliertes Wasser
AF	Asialofetuin
Ak	Antikörper
AP [®]	<i>Array Processor[®]</i>
AT	<i>Array Tube</i>
β-PL	β-Propiolakton
b	biotinyliert
BEI	β-Ethylenimin
bp	Basenpaare
BHK	<i>baby hamster kidney cells</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BWA	<i>biological warfare agent</i>
BW	biologische Waffen
bzw.	beziehungsweise
CDC	<i>Centers of Disease Control and Prevention</i> (Atlanta, USA)
CHIKV	<i>Chikungunya Virus</i>
cfu	<i>colony forming units</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CPE	cytopathischer Effekt
Ct	<i>cycle threshold</i>
Cy5	<i>N,N'-biscarboxypen-tyl-5,5'-Disulfonato-indodicarbocyanine</i>
DenV	Denguevirus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
ds	<i>double strand</i> (doppelsträngig)
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EEEV	<i>Eastern Equine Encephalitis Virus</i>
EHEC	enterohämorrhagische <i>E.coli</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
EthBr	Ethidiumbromid
F	Fänger
FAM	6-carboxyfluoresceine
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
g	Gravitation, Erdbeschleunigung
GAM	goat anti-mouse
GC-Gehalt	Anteil der Basen Guanin und Cytosin in der DNA
h	Stunde
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Hybridisierung	Als Hybridisierung bezeichnet man die Reassoziaton einzelsträngiger Nukleinsäuren zu einem doppelsträngigen Molekül. Dieser Prozess ist reversibel und unterliegt einem thermodynamischen Gleichgewicht.

Hybridisierungssonden	Als Hybridisierungssonden bzw. Fängersonden werden die auf dem Biochip immobilisierten Oligonukleotide bezeichnet, welche bei Sequenzhomologien das PCR-Amplikon binden. Im Zusammenhang mit Microarrays bezieht sich der Begriff der Sonde ebenso auf die Hybridisierungssonden. Hybridisierungssonden sind nicht mit TaqMan-Sonden zu verwechseln, welche an der real-time PCR bzw. RT-PCR beteiligt sind.
k. A.	keine Angabe
KAc	Kaliumacetat
KID ₅₀ /ml	Kultur infektiöse Dosis 50 % pro ml
mAk	monoklonaler Antikörper
Mismatch	Ein Mismatch ist eine Basenfehlpaarung (nicht C mit G oder A mit T/U) bei der Hybridisierung einzelsträngiger Nukleinsäuren bzw. der Replikation und Transkription. Eine Mismatch-Basenpaarung bildet nur eine oder zwei Wasserstoffbrückenbindungen aus und besitzt dabei eine geringere Bindungsenergie. Dies vermindert die Stabilität des Doppelstrangmoleküls.
MKT	Mikrotiterplatte
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MP	Milchpulver
MR	<i>molecular ratio</i>
NaN₃	Natriumazid
n.d.	nicht durchgeführt
NK	Negativkontrolle
nt	Nukleotid(e)
NW	Nachweis
NW-Ak	Nachweis-Antikörper
OPV	Orthopockenviren
pAk	polyklonaler Antikörper
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-F	PBS mit FCS
PBS-FT	PBS mit FCS und Tween 20
PBS-T	PBS mit Tween 20
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PK	Positivkontrolle
^P RA _{mo}	Peroxidase-gekoppelter anti-Maus Antikörper aus Kaninchen
RCA 60	<i>ricinus communis agglutinin 60 kDa</i>
RCA 120	<i>ricinus communis agglutinin 120 kDa</i>
REM	Rasterelektronenmikroskop
RKI	Robert-Koch Institut, Berlin
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rt	<i>real-time</i>
Rt.	Raumtemperatur
RT	<i>Reverse Transcriptase</i>
rt PCR	<i>real-time polymerase chain reaction</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase polymerase chain reaction</i>
rt RT-PCR	<i>real-time Reverse Transcriptase polymerase chain reaction</i>
SA	Streptavidin
ss	<i>single strand</i> (einzelsträngig)
TAMRA bzw. TMR	5-Carboxytetramethylrhodamin

Target	Als PCR-Target, -Amplikon oder -Produkt werden die in der RT-PCR bzw. PCR mit forward und reverse Primern spezifisch gebildeten Genabschnitte bezeichnet. Diese stellen für verschiedene Viren spezifische Gensequenzen dar, über die diese differenziert werden können.
TBE	Tris-Bor-EDTA-Puffer
TCID ₅₀ /ml	<i>tissue culture infectious dose 50 % per ml</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TiHo Hannover	Tierärztliche Hochschule Hannover
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl) aminomethan
V	Volt
VacV	Vaccinia Virus
VEEV	<i>Venezuelan Equine Encephalitis Virus</i>
WEEV	<i>Western Equine Encephalitis Virus</i>
WIS	Wehrwissenschaftliches Institut für Schutztechnologie – ABC-Schutz
WNV	<i>West Nile Virus</i>
YFV	<i>Yellow Fever Virus</i>
ZKÜ	Zellkulturüberstand

3 Einleitung

3.1 Arboviren

Viren, welche von Insekten oder Spinnentieren (Arthropoden) übertragen werden, nennt man Arboviren (*arthropod-borne viruses*). Die Gruppenzugehörigkeit zu den Arboviren ergibt sich allein durch den Übertragungsweg. Die abwechselnde Replikation in unterschiedlichen Wirten stellt einen ungewöhnlichen Evolutionsdruck für die Viren dar, entsprechend limitiert sich die Adaption der Arboviren auf folgende Familien von RNA-Viren: Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae, Reoviridae und Orthomyxoviridae [1,2].

Die Verbreitung der Arboviren erfolgt über einen Zyklus zwischen Arthropoden-Vektoren und empfänglichen Wirbeltierwirten. Bei den Wirbeltierwirten gibt es zwei wichtige zu unterscheidende Gruppen: jene, welche epidemiologisch wichtig sind, da sie als Hauptinfektionsquelle für die Vektoren dienen und zusammen mit den Vektoren als Arbovirusreservoir, -verbreiter und -vermehrer dienen, und jene, welche kein Reservoir darstellen, aber eine offenkundige Erkrankung nach Infektion aufweisen können. Menschen stellen so genannte tangentielle Wirte dar, ihre Infektion findet meist zufällig statt und diese hat keinen Einfluss auf den Hauptverbreitungszyklus der Viren [3].

Die Einteilung der Arboviren erfolgte in der Vergangenheit aufgrund von Hämagglutinationsinhibitionstests und Neutralisationsassays in zwei serologische Gruppen [3-7]. Weitere morphologische, strukturelle und molekularbiologische Untersuchungen führten zur endgültigen Einteilung der Arboviren in die Gruppen A und B. Gruppe A beinhaltet das Genus Alphaviren der Familie Togaviridae, Gruppe B schließt das Genus Flaviviren der Familie Flaviviridae ein [7-10].

Der Transmissionszyklus von Arboviren beginnt mit der Blutmahlzeit eines uninfizierten, suszeptiblen Arthropoden von einem infizierten Vertebraten. Nach der Replikation des Virus im Insektendarm und dessen Transmission in andere Gewebe gelangen die Viruspartikel in das Hämocoel [11,12]. Der anschließende Transport der Viren erfolgt über die Hämolymphe oder entlang der Nerven in verschiedene Organe und Gewebe, darunter auch die Speicheldrüsen, wo eine erneute Replikation stattfindet. Bei einem wiederholten Arthropodenstich erfolgt die Übertragung der Viren aus der Speicheldrüse auf den Vertebratenwirt. Ferner ist die transstadiale, transovariale und geschlechtliche Transmission von Arboviren dokumentiert [3,12,13].

3.1.1 Arboviren Gruppe A – Alphaviren

Alphaviren haben eine weitreichende geographische Verbreitung, welche die Anwesenheit ihrer Vektoren reflektiert. Demnach sind Alphaviren in den Tropen zu finden bzw. wurden aufgrund der Klimaerwärmung mit ihren Vektoren in neue bis dahin nicht endemische Gebiete übertragen [14,15]. Die Mitglieder des Genus Alphaviren werden in natürlichen Zyklen zwischen einem Arthropoden-Vektor und einem suszeptiblen Wirbeltierwirt verbreitet.

Die Virusspezies der Alphaviren können aufgrund ihrer geographischen Verbreitung in Alte Welt- und Neue Welt-Viren unterteilt werden [14,16,17]. Alte Welt-Viren wie das *Ross-River*-, *Barmah-Forest*-, *O'nyong-nyong*-, *Chikungunya*-, *Mayaro*-, und das *Sindbis-Virus* verursachen Erkrankungen, welche durch Gelenkschmerzen, Fieber und Ausschlag charakterisiert sind [18-20]. Neue Welt-Viren wie die Viren der Venezuelanischen, Westlichen und Östlichen Pferdeenzephalitis (VEEV, WEEV und EEEV) rufen dagegen Enzephalitiden hervor [18,21].

Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen antigenen Komplexe des Genus Alphavirus [14,18,22,23]

Alphavirus-Komplex	Virus
Barmah Forest Komplex	<i>Barmah-Forest-Virus</i>
EEE Komplex	<i>Eastern-Equine-Encephalitis-Virus</i>
Middleburg Komplex	<i>Middleburg-Virus</i>
Ndumu Komplex	<i>Ndumu-Virus</i>
Semliki Forest Komplex	<i>Bebaru-Virus</i> <i>Chikungunya-Virus</i> <i>Getah-Virus</i> <i>Mayaro-Virus</i> <i>O'Nyong-Nyong-Virus</i> <i>Ross-River-Virus</i> <i>Semliki-Forest-Virus</i> <i>Una-Virus</i>
Sindbis-like Virus Komplex	<i>Sindbis-Virus</i> <i>Whataroa-Virus</i>
VEE Komplex	<i>Venezuelan-Equine-Encephalitis-Virus</i>
WEE Komplex	<i>Aura-Virus</i>
Rekombinanten	<i>Buggy-Creek-Virus</i> <i>Fort-Morgan-Virus</i> <i>Highland-J-Virus</i> <i>Western-Equine-Encephalitis-Virus</i>
noch nicht klassifizierte Viren	

Bisher wurden fast 30 Alphaviren weltweit isoliert und klassifiziert [10,14,15,18,22,24-26]. Aufgrund von phylogenetischen, morphologischen und geographischen Untersuchungen erfolgte eine Klassifizierung der Alphaviren in verschiedene Komplexe. Diese Einteilung unterscheidet sich in verschiedenen Veröffentlichungen meist abhängig von der Untersuchungsmethode bzw. welche Genabschnitte der Viren zur Klassifizierung herangezogen wurden [14,18,22]. Aus Tabelle 1 kann eine modifizierte Übersicht über die Klassifizierung der Alphaviren entnommen werden [14,18,22,23].

Bei vergleichenden Analysen von Alphavirus-Genomen wurde gezeigt, dass ein genomisches Rekombinationsereignis zwischen EEEV und einem Sindbis-Virus-ähnlichen Urahn zu der Entstehung des WEEV-Virus geführt hat [14,17,22,27,28]. Der WEEV-Abkömmling besitzt hohe Sequenzähnlichkeiten mit den E1- und E2-Strukturproteinen des Sindbis-ähnlichen Vorgängers während das restliche Genom überwiegend Homologien zu EEEV aufweist.

3.1.1.1 Morphologie

Alphaviren weisen einen Durchmesser von 60 bis 70 nm auf und besitzen ein ikosaedrisches Nukleocapsid, das von einer eng anliegenden Hülle umgeben ist, dessen Glycoprotein-Komponenten ein ikosaedrisches Gitter darstellen (Abbildung 1a und b) [14,29,30].

Die Virushülle, welche der Plasmamembran infizierter Zellen entstammt, besteht aus einer Lipid-Doppelschicht, in die viele Kopien der viruscodierten Glycoproteine E1 und E2 eingebettet sind. E1 und E2 bilden ein stabiles Heterodimer, in dem beide Glycoproteine die Produktion neutralisierender Antikörper bewirken und das E2-Glycoprotein die Bildung von Hämagglutinationsinhibitions-Antikörpern hervorruft [31,32].

3.1.1.2 Das virale Genom

Alphaviren besitzen ein ca. 11,5 kb großes, plusstrangorientiertes, einzelsträngiges RNA-Genom [33,34]. Das Virusgenom kann in zwei unterschiedliche Regionen unterteilt werden: die Nichtstruktur-Domäne (5'-terminale zwei Drittel) und die Struktur-Domäne (3'-terminales Drittel) (Abbildung 1c). Die Nichtstrukturproteine werden direkt von der genomischen RNA in ein oder zwei Polyproteine translatiert und im Anschluss in die Einzelkomponenten prozessiert. Die Strukturdomäne wird als Polyprotein aus der subgenomischen 26S mRNA, welche aus dem RNA-Negativstrang gebildet wird, translatiert. Genau wie die genomische RNA besitzt die 26S mRNA ein 5'-Cap und einen 3'-Poly-A-Schwanz [14,35].

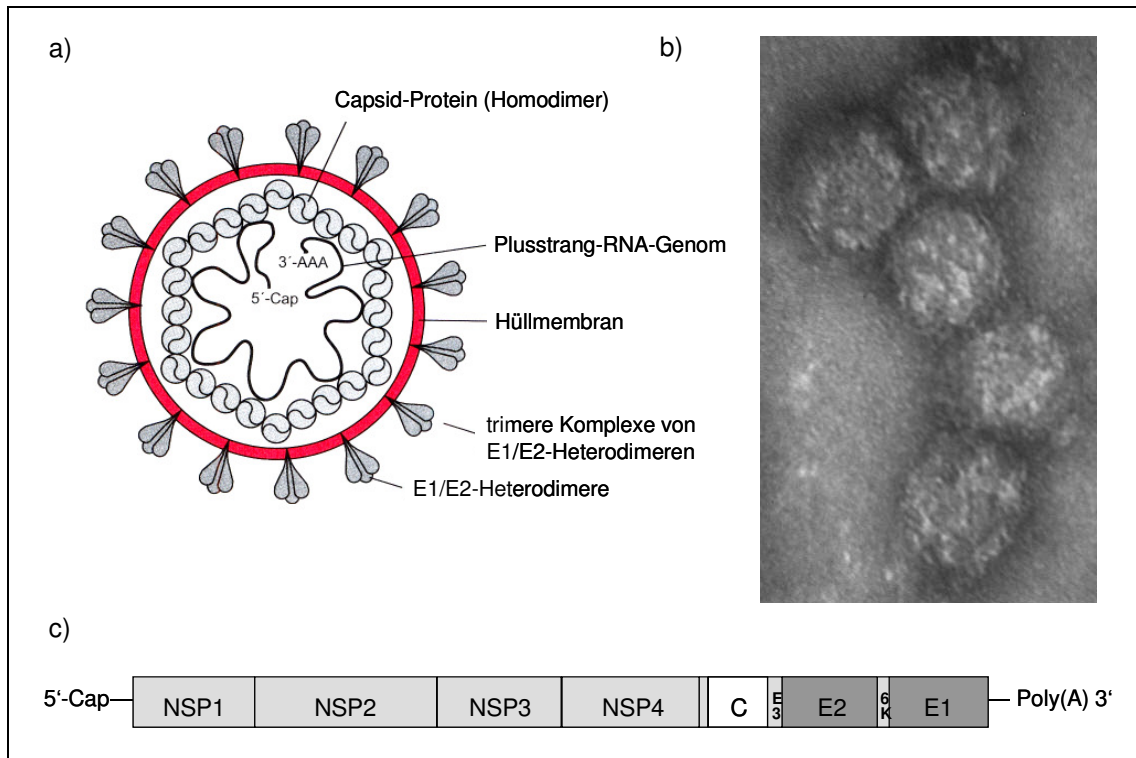


Abbildung 1: Struktur, Morphologie und Aufbau des Genoms von Togaviren

a) Schematischer Aufbau, b) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme und c) Genomaufbau von Togaviren am Beispiel des Venezuelanischen Pferdeenzephalitis-Virus TC-83

(Quelle: a und c: Molekulare Virologie; Modrow, 2.Auflage (nähere Erklärung siehe Text); b: Biologisches Zentrallabor, WIS)

Im Folgenden soll ein Überblick über das am häufigsten in dieser Arbeit verwendete Alphavirus, das Venezuelanische Pferdeenzephalitis-Virus (VEEV), gegeben werden.

3.1.1.3 Das Venezuelanische Pferdeenzephalitis-Virus

Nach einer Epidemie mit vielen toten Einhufern [36] konnte in den 1930er Jahren das verursachende Agens in Form des Venezuelanischen Pferdeenzephalitis-Virus (VEEV) isoliert und charakterisiert werden [37-39]. Die Beschreibung der ersten Infektionen beim Menschen erfolgte wenig später [40].

VEEV und damit verwandte VEE-Komplex-Viren werden durch Moskitos unter empfänglichen Säugerwirten verbreitet. VEEV ist als Aerosol hoch infektiös und hat infolgedessen zu vielen Laborinfektionen geführt [40-44]. Diese Tatsache führt dazu, dass sich ein nicht unwesentlicher Teil des Forschungsinteresses auch auf VEEV als biologischer Kampfstoff im Krieg oder für terroristische Angriffe bezieht [26,41,45].

Bei einer Infektion mit VEEV liegt die Sterblichkeit bei ca. 1 %, neurologische Spätschäden aufgrund einer durch VEEV hervorgerufenen Enzephalitis sind jedoch weit verbreitet [26,41,46-48].

Ein Impfstoff, welcher für Pferde aber auch gefährdetes Personal eingesetzt wird, wurde durch die Passage des equin-virulenten epizootischen VEEV-Stammes Trinidad-Donkey (TrD) in Meerschweinchen-Herzzellen generiert [26,31,33,49-51]. Diese lebend attenuierte VEEV-Vakzine TC-83 unterscheidet sich im Vergleich zu TrD in seiner Neurovirulenz [31,52-55]. Der attenuierte Phänotyp von TC-83 scheint das Ergebnis einer Mutation im E2-Gen und in der *5'-noncoding region* (5'-NCR) zu sein [31].

3.1.1.3.1 Serologische Subtypen des VEE-Virus

Die Spezies VEEV kann aufgrund ihrer Antigenität in 6 Subtypen eingeteilt werden (Subtyp I bis VI): Subtyp I enthält 5 (IAB, IC, ID, IE und IF) und Subtyp III 4 Varianten (A, B, C und D) [14,18,26,32,33,56-66]. Die verschiedenen VEEV-Isolate zeigen des Weiteren große Unterschiede hinsichtlich ihrer Serologie, Virulenz und geographischen Herkunft [64,67] und ihrem epidemiologischen Potential [58,64,67-72]. In Tabelle 2 ist die Klassifizierung der serologischen Gruppen des VEEV-Komplexes zusammengefasst.

Das Transmissionsmuster von VEEV kann in zwei unterschiedliche ökologische Zyklen unterteilt werden: epizootisch und enzootisch (endemisch) [33,58]. Die Varianten IAB und IC verbreiten sich epizootisch, die anderen VEEV-Subtypen und serologischen Gruppen enzootisch.

Tabelle 2: Klassifizierung des VEE-Komplexes [14,18,26,58,62-66]

serologische Gruppe	Spezies	antigenische Varianten	Stämme/Isolate	Übertragungsmuster
I	VEEV	AB	Trinidad-Donkey (TrD) TC-83	epizootisch
	VEEV	C	P676	epizootisch
	VEEV	D	3880	enzootisch
	VEEV	E	Mena II	enzootisch
	Mosso das Pedras Virus	F	78V-3531	enzootisch
II	Everglades-Virus		Fe3-7c	enzootisch
III	Mucambo-Virus	A	Mucambo A	enzootisch
	Tonate-Virus	B	Tonate (Bijou Bridge)	enzootisch
	Mucambo-Virus	C	Mucambo 71D-1252	enzootisch
	Mucambo-Virus	D	Mucambo V407660	enzootisch
IV	Pixuna-Virus		BeAr 35645	enzootisch
V	Cabassou-Virus		CaAr508	enzootisch
VI	Rio Negro-Virus		Ag80-663V	enzootisch

Alle bisher dokumentierten großen VEEV-Ausbrüche waren mit den epizootischen VEEV-Varianten IAB und IC assoziiert [47,57,73-75]. Enzootische VEEV-Serotypen sind equin-avirulent, können Pferde nicht als Amplifikationswirte nutzen und somit keine weit verbreitete Erkrankung hervorrufen [62,70,73,76-78]. Infektionen mit enzootischen VEEV-Stämmen resultieren bei Equinen in einer geringtitrigen Virämie und milden oder keinen Krankheitssymptomen [26,47,70]. Eine Infektion kann aber für den Menschen pathogen und unter Umständen tödlich sein [26,79-81].

Über die Herkunft der epizootischen VEEV-Stämme gibt es verschiedene Hypothesen [26,47]. Die Theorie, dass das periodische Auftreten epizootischer Viren durch Mutationen enzootischer Stämme hervorgerufen wird, wurde durch antigenische und genetische Ähnlichkeiten zwischen epizootischen und enzootischen Populationen von VEEV unterstützt und gilt bislang als die wahrscheinlichste Annahme [26,33,47,48,58,82-84].

3.1.2 Arboviren Gruppe B – Flaviviren

Die Familie der Flaviviridae besteht aus drei Genera, denen über 70 Flavivirustypen angehören [85]. Das Genus der Pestiviren umfasst eine Reihe von Erregern schwerer Tierseuchen, so z.B. Viren, welche die Klassische Schweinepest hervorrufen (*Classical-Swine-Fever-Virus*). Genauso wie das Hepatitis-C-Virus, welches der einzige Vertreter des Genus Hepacivirus ist, werden Pestiviren nicht durch Arthropoden übertragen [85].

Die Gattung der Flaviviren umfasst sowohl human- als auch tierpathogene Erreger, welche - von Arthropoden-Vektoren übertragen - hämorrhagische Erkrankungen und Enzephalitiden hervorrufen können. Dazu gehören das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSME-Virus), das Gelbfieber-Virus (*Yellow Fever Virus* – YFV), die Dengueviren Typ 1 – 4 (DenV1-4), das West-Nil-Virus (WNV) sowie die Erreger der Japanischen (JEV) und der St.-Louis-Enzephalitis (SLEV) [2,85].

Die *in vitro*-Kultivierung von Gelbfieber-Viren in Medium, welches Hühnerembryo-Gewebe enthielt, führte zum Verlust der viscerotropen und einer Verminderung der neurotropen Virulenz des Virus [86]. Dieser avirulente, lebend-attenuierte Virusstamm YFV 17D wird bis heute zur Immunisierung gegen das Gelbfieber-Virus verwendet.

3.1.2.1 Morphologie

Infektiöse Flaviviruspartikel haben einen Durchmesser von 40 bis 50 nm und sind behüllt. Ihre sphärischen Capside, welche aus dem basischen C-Protein aufgebaut sind, beinhalten das einsträngige plusstrangorientierte RNA-Genom. In die Hüllmembran sind zwei virale Oberflächenproteine, das M- und das E-Protein, eingelagert (Abbildung 2a und b). Das größere E-Protein ist ein Hämagglutinin und für die Virusadsorption und die Bildung neutralisierender Antikörper verantwortlich. Anstelle des M- und E-Proteins findet man beim Hepatitis-C-Virus die glycosylierten Oberflächenproteine E1 und E2 [3,9,85].

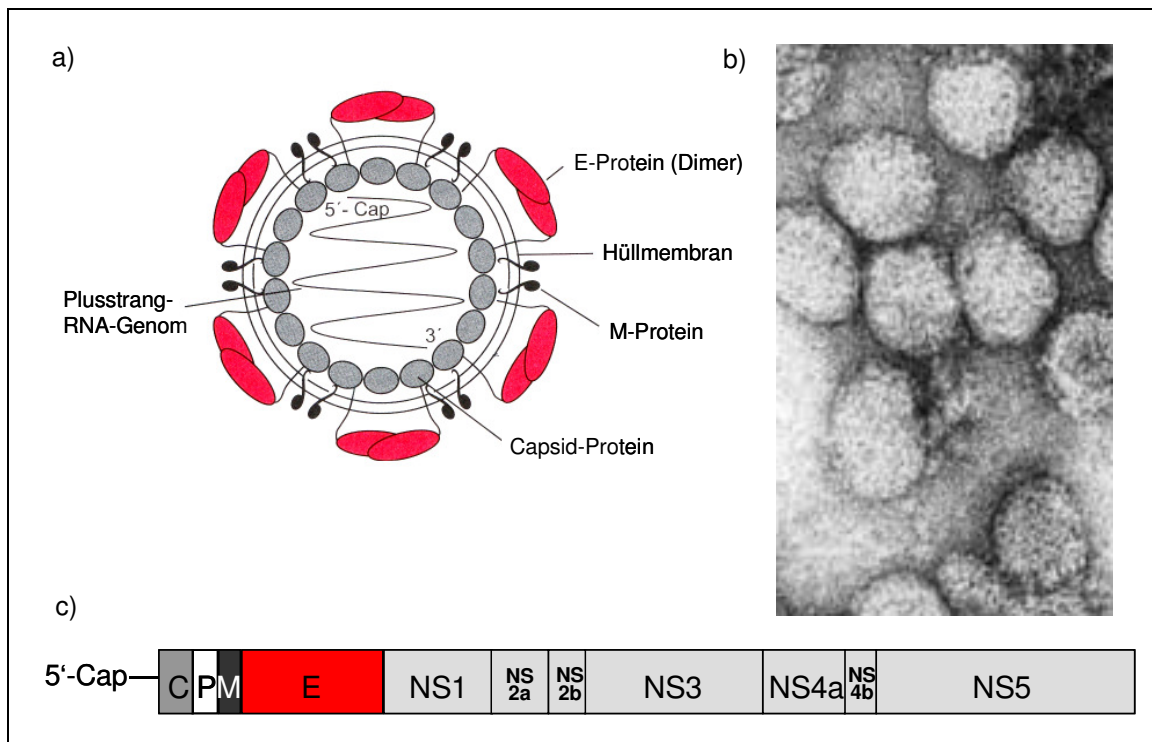


Abbildung 2: Struktur, Morphologie und Aufbau des Genoms von Flaviviren

a) Schematischer Aufbau, b) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme und c) Genomaufbau von Flaviviren am Beispiel des Gelbfieber-Virus

(Quelle: a und c: Molekulare Virologie; Modrow, 2.Auflage (nähere Erklärung siehe Text); b: CDC, *Public Health Image Library*)

3.1.2.2 Das virale Genom

Das einzelsträngige RNA-Genom umfasst je nach Virus eine Länge von 9,1 bis 11 kb. Die RNA liegt in Plusstrangorientierung vor, das heißt, das Genom kann direkt für die Translation der Virusproteine genutzt werden. Der Leserahmen, welcher für ein Polyprotein codiert, wird an beiden Enden von nichttranslatierten Nukleotidfolgen flankiert. Am 5'-Ende des RNA-Genoms der Flavi- und Pestiviren befindet sich eine Cap-Struktur, die Polyadenylation am 3'-Ende fehlt jedoch [3,9,85].

Im aminoterminalen Drittel des RNA-Genoms befinden sich die Sequenzen der Strukturproteine (Capsidprotein und Vorläuferprotein der Membranproteine), daran schließen sich die Gene der Nichtstrukturproteine NS1 bis NS5 an, welche zusammen mit zellulären Proteinen für die Prozessierung des Vorläuferproteins in die einzelnen, funktionellen Virusbestandteile sorgen (Abbildung 2c) [85].

3.2 Pockenviren

Neben den bereits beschriebenen Alpha- und Flaviviren wurde für die vorliegende Arbeit auch mit dem Vaccinia-Virus, welches zur Gattung der Orthopockenviren gehört, gearbeitet.

Die Familie der Pockenviren wird in zwei Unterfamilien eingeteilt: in die *Entomopoxvirinae*, welche die Pockenviren der Insekten beinhalten, und die *Chordopoxvirinae*, die Pockenviren der Vertebraten [87]. Die *Chordopoxvirinae* werden ihrerseits in 6 Genera unterteilt. Dem Genus der Orthopockenviren (OPV) entstammen das humanpathogene Variola-Virus und der davon abgeleitete Impfstamm, das Vaccinia-Virus (VacV) sowie das Kamel-, Affen- und Kuhpocken-Virus. Die anderen Genera umfassen die Pockenviren unterschiedlichster Wirbeltiere (Vögel, Schweine, Nager etc.). Orthopoxviren verursachen in ihren Wirten systemische Erkrankungen mit einer hohen Morbidität und zum Teil auch einer hohen Mortalität [85,88]. Die Übertragung der Viren erfolgt zumeist über Tröpfcheninfektion, durch Kontakt mit virushaltigen Pockenpusteln oder kontaminierter Haut und Textilien. Nach einer Inkubationszeit von 10 bis 14 Tagen entwickeln Infizierte schwere Symptome wie Fieber und Gliederschmerzen und ca. zwei Tage später den ganzen Körper und die Schleimhäute bedeckende Hautausschläge. Unter Umständen können mit der Infektion meist tödliche Hämorrhagien der Haut und Schleimhäute einhergehen. Die Sterblichkeitsrate bei einer Infektion mit den echten Pocken Variola Major liegt unbehandelt bei 90 %. Findet eine Behandlung statt, versterben ca. 30 % der Infizierten. Eine Infektion mit den weißen Pocken Variola Minor verläuft ähnlich aber weniger schwer [85,89].

Die von der WHO initiierte Impfkampagne gegen die echten Pocken (Variola-Virus) führte in den späten 1970ern zu deren Ausrottung. Die Impfung wurde mit dem Vaccinia-Virus durchgeführt, dessen Herkunft immer noch nicht zweifelsfrei bekannt ist [89,90]. Die Vaccinia-Impfung induziert sowohl eine zelluläre als auch eine humorale Immunität gegen das Variola-Virus und aufgrund einer Kreuzimmunität auch gegen die meisten tierischen Pockenviren [85,89,91]. Die Ausrottung der Pocken gelang nur durch das Zusammenspiel verschiedener Faktoren, welche für das Variola-Virus einzigartig sind: eine Infektion und Erkrankung mit Pocken lässt sich einfach diagnostizieren, subklinische Infektionen treten nicht auf, es kommt zu keiner Virustransmission während des Prodromalstadiums und ein tierisches Reservoir für das Variola-Virus ist nicht existent [89,92].

Die Ausrottung der Pocken und die unter Umständen schweren Impfkomplicationen [93] führten dazu, dass die Vakzinierung gegen Pocken in den 1980er Jahren eingestellt wurde. Die Immunität der Bevölkerung gegen die Pockenviren verringert sich somit kontinuierlich, so dass das Infektionsrisiko z.B. im Zusammenhang mit bioterroristischen Anschlägen wächst [45,85,89].

3.2.1 Morphologie

Pockenviren sind die bisher größten Tierviren und können mit einer Immunfärbung in infizierten Zellen unter dem Lichtmikroskop visualisiert werden. Pockenviruspartikel haben eine ovale bis backsteinförmige Form und messen ca. 300 nm mal 100 bis 200 nm. Sie bestehen aus über 100 Polypeptiden, welche in 4 unterschiedliche Strukturen organisiert sind: Core/Capsid, Lateralkörper, innere und äußere Hüllmembran [88,94-96].

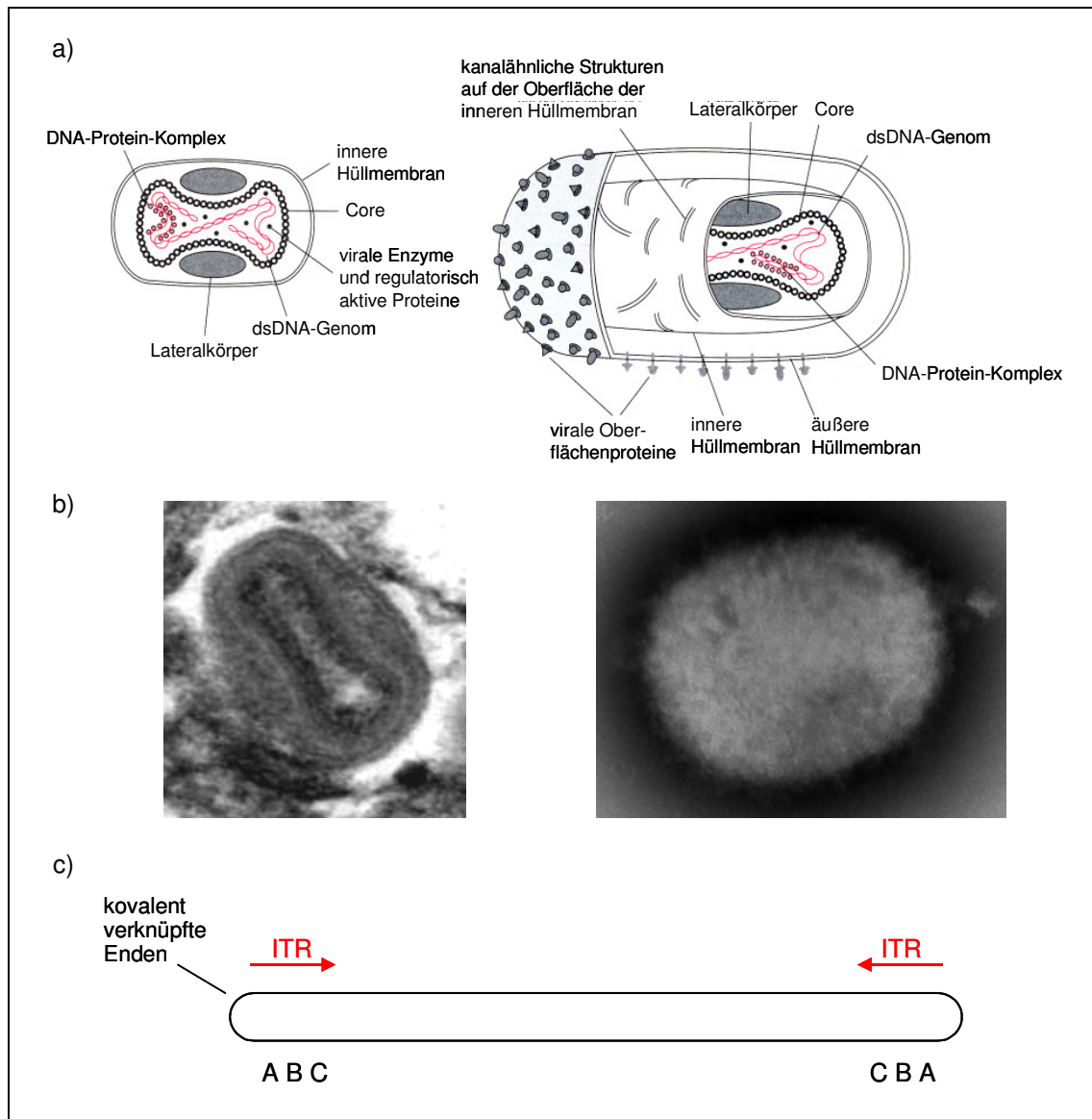


Abbildung 3: Struktur, Morphologie und Aufbau des Genoms von Pockenviren

a) Schematischer Aufbau der intrazellulären und der extrazellulären Form der Pockenviren, b) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen (Ultradünnschnitt und ganzes Viruspartikel im Negativkontrast) und c) Genomaufbau von Pockenviren am Beispiel des Vaccinia-Virus (nähere Erläuterung siehe Text)

(Quelle: a und c: Molekulare Virologie; Modrow, 2.Auflage (nähere Erklärung siehe Text); b: Biologisches Zentrallabor, WIS)

Die Virionen enthalten ein bikonkaves Capsid, welches das lineare, s-förmig gefaltete DNA-Genom enthält (Abbildung 3b). Das Capsid ist zusammen mit zwei Lateralkörpern, deren Funktion bisher nicht bekannt ist, von einer zweifachen Hüllmembran mit kanalartigen Strukturen umgeben. Diese intrazelluläre Form des Pockenviruspartikels liegt innerhalb der infizierten Zelle vor (Abbildung 3a). Die extrazelluläre Form des Pocken-Virions besitzt eine weitere aus dem *trans*-Golgi Netzwerk stammende Membranhülle, in die mindestens sieben virale Oberflächenproteine eingelagert sind (Abbildung 3a und b rechts) [88,97-99]. Sowohl die intrazellulären als auch die extrazellulären Viruspartikel sind infektiös, letztere sind für die Übertragung der Infektion zwischen verschiedenen Individuen verantwortlich.

3.2.2 Das virale Genom

Das lineare, doppelsträngige DNA-Genom der Pockenviren variiert in seiner Länge je nach Vertreter zwischen 130 und 300 kbp. An den Enden sind die beiden Genomstränge durch kovalente Bindungen geschlossen. Die Enden des DNA-Genoms sind identisch und zueinander gegenläufig orientiert und weisen tandemartig angeordnete Sequenzwiederholungen von je 70 Basenpaaren auf, welche *inverted terminal repeats* (ITR) genannt werden (Abbildung 3c). Die Länge der ITRs kann je nach Virustyp von 725 bp (Variola-Virus) bis zu 10,5 kbp (Vaccinia-Virus) betragen [85,100].

Die 150 bis 200 viralen Proteine werden auf beiden DNA-Strängen in verschiedenen nicht miteinander überlappenden Leserahmen codiert. Die früh bzw. spät in der Replikation transkribierten Gene sind in verschiedene Gruppen geclustert. Neben den Strukturproteinen für Capsid, innere Hüllmembran und Oberflächenproteine codiert das Pockengenom auch für eine Reihe von Enzymen, welche u.a. für die DNA-Replikation, die Transkription, die RNA-Modifikation und den Nukleinsäurestoffwechsel essentiell sind. Des Weiteren werden im Laufe der Virusreplikation Proteine zur Modulation der Virulenz exprimiert, welche eine Anpassung an den Wirt und dessen Immunantwort auf die Virusinfektion erlauben [85,101-103].

3.3 *Biologische Waffen*

Die im vorherigen Abschnitt näher erläuterten Alpha-, Flavi- und Orthopockenviren besitzen aufgrund ihrer Eigenschaften hohe Morbiditätsraten und unter Umständen hohe Mortalitätsraten hervorzurufen, das Potential als biologische Kampfstoffe eingesetzt zu werden.

Als biologische Kampfstoffe (*biological warfare agent* – BWA) werden Pathogene (Viren, Bakterien und Pilze) oder Toxine definiert, welche Menschen, Tieren oder Ernten Schaden zufügen und daher für die biologische Kriegsführung oder Terrorismus genutzt werden können [45].

Das CDC (*Centers of Disease Control and Prevention*) in Atlanta, USA, klassifiziert biologische Agenzien (Bakterien, Viren und Toxine) anhand ihrer Eignung und Verwendbarkeit als potentielle biologische Kampfstoffe in drei Kategorien. Kategorie-A-Agenzien können leicht ausgebracht und zwischen verschiedenen Individuen übertragen werden. Durch ihre hohe Mortalitätsrate stellen sie eine bedeutende Gefahr für die Volksgesundheit dar. Agenzien der zweithöchsten Priorität (Kategorie B) sind relativ leicht auszubringen und Infektionen resultieren in mäßigen Morbiditäts- und geringen Mortalitätsraten. In die Kategorie C werden aufgrund ihrer Verfügbarkeit, der leichten Produktion und Verbreitung neu auftretende Infektionskrankheiten, welche z.B. durch das Hanta- und das Nipah-Virus aber auch durch Flaviviren verursacht werden, eingeordnet. Sie könnten aufgrund ihrer Eigenschaften in Zukunft als BWA nutzbar gemacht und ausgebracht werden.

In Tabelle 3 ist eine Übersicht über die vom CDC einklassifizierten Bakterien, Viren und Toxine mit der durch sie hervorgerufenen Erkrankung bzw. Symptomen und der Letalität bei Nichtbehandlung dargestellt.

Tabelle 3: Übersicht über Bakterien, Viren und Toxine, welche potentielle biologische Kampfstoffe darstellen (Quelle: CDC)

Name	Erkrankung / Symptome	Kategorie laut CDC	Letalitätsrate (unbehandelt)
<u>Bakterien</u>			
Gattung <i>Brucella</i>	Brucellose (Maltafieber)	B	< 5 %
<i>Burkholderia mallei</i>	Rotz	B	bis zu 100 %
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Melioidose	B	bis zu 80 %
<i>Bacillus anthracis</i>	Anthrax	A	bis zu 80 %
<i>Chlamydia psittaci</i>	Psittakose	B	20 – 30 %
<i>Coxiella burnetii</i>	Queenslandfieber	B	< 2 %
<i>Francisella tularensis</i>	Tularämie	A	bis zu 60 %
<i>Yersinia pestis</i>	Pest	A	90 – 100 %
Bakterien aus kontaminierten Lebensmitteln und Trinkwasser (z.B. <i>E.coli</i> H157:O7, <i>Salmonella</i> species, <i>Shigella</i> , <i>Vibrio cholerae</i> etc.)	Lebensmittelvergiftung mit Fieber und starkem Durchfall	B	variiert zwischen 3 % und 60 % (je nach Bakterium)
<u>parasitäre Bakterien</u>			
<i>Rickettsia prowazekii</i>	Fleckfieber	B	bis zu 30 %
<u>Viren</u>			
Enzephalitis-Viren (Alphaviren)	Enzephalitiden	B	bis zu 50 %
Hämorrhagische Viren (z.B. Ebola-, Marburg-, Lassa-Viren)	Hämorrhagisches Fieber	A	90 – 100 %
Variola major	Pocken	A	bis zu 90 %
<u>Toxine</u>			
<i>Clostridium botulinum</i> -Toxin	Hemmung der Signalübertragung (irreversible Lähmung)	A	bis zu 90 %
Epsilon-Toxin von <i>Clostridium perfringens</i>	schwere Lebensmittelvergiftung	B	bis zu 40 %
Ricin	Vergiftung (Lähmung, Kreislaufkollaps etc.)	B	bis zu 100 %
<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin B	Lebensmittelvergiftung mit Fieber und starkem Durchfall	B	bis zu 25 %

3.4 Microarrays

Unter Microarrays versteht man molekularbiologische und immunologische Untersuchungssysteme, die eine parallele Analyse verschiedener Einzelnachweise erlauben. Sie können aus bis zu mehreren tausend verschiedenen Fänger-Molekülen bestehen, welche in Form von Spots – einer abgegrenzten meist runden Fläche mit einem Durchmesser zwischen 50 und 200 µm – an eine Trägeroberfläche immobilisiert sind. Nukleinsäure-Arrays bestehen aus immobilisierten DNA-Sonden, welche zur Detektion von DNA, RNA und/oder mRNA genutzt werden. Proteine werden oft mit Hilfe von Antikörpern (Ak) auf Protein-Arrays detektiert. Für die Detektion wird entweder das nachzuweisende Molekül oder aber ein Nachweis-Antikörper z.B. Fluoreszenz-markiert. Nach erfolgter Reaktion wird das Ergebnis über einen Detektor ausgelesen und kann datentechnisch verarbeitet werden.

Die gespotteten Fänger-Moleküle befinden sich in der Regel in mehreren Replikaten zur Erhöhung der Verlässlichkeit der Ergebnisse auf der Biochip-Oberfläche. Nach der Auslesung der Ergebnisse eines Microarray-Experimentes kann über die Replikate der Median, ein robuster Messwert, welcher außenliegende Messwerte innerhalb eines Replikasets ignoriert, berechnet werden. Neben den Fänger-Molekülen für spezifische Proteine oder Nukleinsäure-Fragmente besteht die Möglichkeit, eine Negativ- und eine Positivkontrolle auf dem Biochip aufzubringen. Diese Kontrollen erlauben die Abschätzung der Array-Qualität über die Hintergrundsignale (Negativkontrolle) und die Signalstabilität und -konsistenz (Positivkontrolle).

Standard-Nachweissysteme zur Identifizierung eines Pathogens wie die Kultur von Mikroorganismen sind an ein Labor und gut ausgebildete Laboranten gebunden, sowie oft zeit- und geldaufwendig [104-106]. Experimente mit Microarrays bergen gegenüber diesen Methoden eine Reihe von Vorteilen: das Einsparen wertvoller Proben, die Verminderung von Arbeitsschritten durch den Experimentator, die Erhöhung der Produktivität durch Hochdurchsatz-Experimente, die Verminderung der benötigten Prozessierungszeit und die Möglichkeit der Integration verschiedener Funktionen in das Experiment, wie die Probenaufarbeitung, die Targetamplifikation und die Produktdetektion [107,108].

Molekularbiologische Arrays sind aufgrund ihrer Schnelligkeit, Spezifität und Sensitivität genauso verbreitet wie immunologische Arrays und insbesondere für die Identifizierung von Pathogenen nützlich, bei denen Antikörper kurz nach einer Infektion nicht sofort im Blut nachzuweisen oder nicht spezifisch genug für die Differenzierung eng verwandter Gruppen sind [104,109-111].

Wie bei jedem biologischen Nachweissystem ergibt sich durch die biologische Variabilität der Probe, die Microarray-Produktionscharge, die Handhabung und die Variabilität durch die Probenprozessierung ein gewisses Maß an Hintergrundsignalen, welche bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen [105,112,113].

3.4.1 Entwicklung der Microarray-Technologie

Die Entwicklung neuer Technologien basiert meist auf der Weiterführung bereits existierender Methoden. In Tabelle 4 ist eine kurze historische Übersicht über die Methoden dargestellt, welche in ihrer Summe zur Entstehung von DNA- und Protein-Microarrays führten. Molekularbiologische und immunologische Untersuchungen mit Arrays – also der parallelen Analyse verschiedener Einzelnachweise – werden seit den 1980er Jahren durchgeführt. Der Begriff der Micro- bzw. Nanoarrays bezieht sich auf die Spotgröße der immobilisierten Fänger-Moleküle, welche dabei im μm - bzw. nm -Bereich liegen.

Zusätzlich ist der Beginn einiger Forschungsschwerpunkte auf dem Gebiet der Nukleinsäure- bzw. Protein-Microarrays in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Geschichtliche Entwicklung der Microarrays

Nukleinsäure-Microarrays	Protein-Arrays
1975 Southern: Immobilisierung einer gelabelten Probe auf einer Membran [114]	seit 1929: Benutzung von Antikörpern zur Präzipitation von Antigenen (Untersuchung in der Serologie) [115]
1980er: DNA-Mapping und Sequenzierung mit Arrays [116,117]	1971 Engvall und Perlman: ELISA [118]
1991 Fodor: Beschreibung von Protein- und Nukleotid-Arrays, ihre Herstellung über Photolithographie und ihre Anwendung [119]	1975 Köhler und Milstein: Hybridoma-Technik zur in vitro Produktion von monoklonalen Antikörpern (mAk) [120]
1995: der „erste“ Artikel über biomedizinische Ergebnisse, welche auf parallele Microarray-Analysen basieren; Einführung des Begriffs „Microarray“ [121]	späte 1980er Ekins: sensitiver, quantitativer Assay durch die Nutzung von Micro-Spots aus Antikörpern auf festen Oberflächen (Multianalyt-Assays durch räumliche Trennung der Spots möglich) [122]
1999: Potential und Einsatzmöglichkeiten von Microarrays [121,123,124]	1998: Spotten von mAk gegen die vier humanen Immunglobulin-Subklassen (IgG) auf ein dünnes Blatt Polystyren (Spots im Durchmesser 200 μm) mit einem Standard-Tintenstrahldrucker [125]
seit 2000: Untersuchung der DNA-Kopienzahl aufgrund krebisbedingter Variationen mit Microarrays [126,127]	1999: Hochdurchsatz-Microarray auf einer Glasoberfläche auf Basis eines ELISAs [128]
seit 2000: Identifizierung von molekularen Subphänotypen (Expressionssignaturen) in der Onkologie, Abschätzung und Vorhersage von Krankheitsverläufen und Therapiewirkung [129,130]	2001: Multiplex-Immunoassays mit Cytokinen [131]

seit 2003: Identifizierung von biologischen Kampfstoffen mit Hilfe von Nukleinsäure-Microarrays [132]	2001: Handgespottete Arrays mit Aks auf Nitrocellulose-Membranen [133]
seit 2004: Untersuchung von Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) [134]	seit 2002: Protein-Nanoarrays mit Spots in der Größenordnung zwischen 100 und 350 nm [135]
2010: Immobilisierung von Oligonukleotiden auf einem Biochip mit Hilfe eines Rasterkraftmikroskops [136]	seit 2006: Identifizierung von biologischen Kampfstoffen mit Protein-Microarrays [137,138]
	2009: hochsensitiver Protein-Microarray auf kristallinem Silikon-Substrat [139]

3.4.2 Anwendungsbereiche von Microarrays

Microarrays können für eine Reihe biologischer Untersuchungen genutzt werden. Tabelle 5 zeigt eine Übersicht der Anwendungs- und Forschungsgebiete der Microarray-Technologie bis zum Jahr 2010.

Tabelle 5: Anwendungen für Microarrays

biochemische Standardprozesse [140]:

- Zellfraktionierung und Lyse
 - Chromatographie
 - Elektrophorese
 - Proben-Konzentrierung
 - PCR
 - DNA-Ligation und Phosphorylierung
 - thermodynamische Analysen oder Hybridisierung
 - Immunoassays
 - Einzelbasen-Extensionsanalysen
-

onkologische und medizinische Untersuchungen [141-144]:

- Charakterisierung der Expressionssignaturen verschiedener Krebstypen
 - Klassifizierung von Tumorarten
 - genetische Variation der phänotypischen Variation in gesunden und kranken Zuständen
 - Verbesserung von Krebstherapien
 - Mechanismen von Krankheiten
 - Identifizierung von Krankheitssubphänotypen
 - Vorhersage von Krankheitsverläufen
-

genetische Untersuchungen [107,142-147]:

- Genotypisierung
 - Bestimmen des Expressionslevels von Genen
 - Identifizierung von Gensequenzen oder Genmutationen
 - Transkriptomuntersuchung
 - Fingerprinting und partielles Sequenzieren durch Oligo-Hybridisierung
 - Definition der Bindungsstelle von Transkriptionsfaktoren
 - DNA-Protein Interaktionen
 - *Single Nucleotide Polymorphism*-Detektionsstudien (SNP)
 - Resequenzierungsanwendungen
 - integrierte Genom-Analyse
 - *Hybridization high-density Screening*
 - *high resolution mapping*
-

Toxikologie [107,142,144]:

- Screening auf Umweltgifte / Toxine und Pathogene basierend auf Veränderungen der genetischen Profile der exponierten Organismen
 - Beurteilung der Bestrahlung mit ionisierender Strahlung und der Toxinexposition durch Expressionsprofiling
 - Feststellen der Toxizität in einem frühen Entwicklungsstadium von Medikamenten
-

Signalwege [107,142,144,148]:

- genregulatorische und biochemische Signalwege
 - Rekonstruktion von metabolischen Signalwegen für die Zellfunktion
 - Gruppierung von Genen in regulatorische Signalwege
-

neue Anwendungsgebiete [107,142,145]:

- *Bead-based Microarray*
 - *Comparative Genomic Hybridization* (a-CGH) (Screening des Genoms nach Veränderungen in der DNA-Kopienanzahl z.B. bei krebsbedingter Variation)
 - Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) (Interaktion regulatorischer Proteine mit dem Genom)
 - Analyse von Splice-Varianten
 - *RNA interference* und microRNA
 - Transposon-Insertionen
-

Anwendungen für Protein-Arrays [149]:

- Immunoassays und Protein-Protein-Interaktionen
 - elektronische Zellseparation
 - Identifikation von Bakterien und Viren,
 - Identifikation von BWAs
 - Benutzung der elektrischen Felder zur Partikel-Manipulation,
 - potentielle Micro-/Nanofabrikationsanwendungen
-

Microarrays können eine Reihe von Ansprüchen erfüllen, welche an moderne Biotektor-Systeme für die Detektion von BWAs gestellt werden. Dazu zählen eine hohe Sensitivität und Spezifität, eine schnelle Messung (< 15 min), ein kompaktes Design für den Feldeinsatz in Kombination mit geringem Gewicht und niedrigem Stromverbrauch, die Möglichkeit der Miniaturisierung, Mikrofabrikation und Automatisierung und die Detektion eines ganzen Sets an BWAs mit einem einzigen Sensor [132].

3.4.3 Spotting und Prozessierung von Microarrays

Für das Spotten von Fänger-Molekülen, d.h. für die Herstellung von Arrays, gibt es drei Hauptmethoden: die Benutzung eines Transferstempels [150], der nadel-basierte Flüssigkeitstransfer [151-156] und die berührungsfreie piezoelektronische Probenabgabe [157]. Für die Immobilisierung von DNA-Sonden (cDNA oder Oligonukleotide) wird zudem neben dem nadel- und piezoelektronisch-basierten Transfer die Photolithographie, die *in-situ*-Synthese von Oligonukleotiden direkt auf dem Biochip, genutzt [119]. Für den genauen Ablauf dieser Spottingmethoden können die oben genannten Quellen hinzugezogen werden.

Als Trägermaterial für die Herstellung von Microarrays können die Fänger-Moleküle auf einer Glasoberfläche bzw. anderen festen Oberflächen (z.B. Goldoberflächen [158]) immobilisiert werden. Unabhängig von der Spottingmethode ist es in der Regel nötig die Oberfläche vorher zu modifizieren, um die Immobilisierung der Fänger-Antikörper bzw. DNA-Sonden zu gewährleisten. Alternativ können auch dreidimensionale mikroporöse Substrate wie Nitrocellulose, Polyacrylamid-Gelkissen und Agarosefilme als Substrate für Microarrays genutzt werden [159,160].

In einigen Veröffentlichungen werden folgende Vorteile von Glasträgern gegenüber Nylonoberflächen bei der Herstellung von Microarrays aufgeführt: die Sonden können nicht nur adsorptiv sondern auch kovalent und ionisch auf der behandelten Glasoberfläche gebunden werden; Glas ist ein haltbares Material und widersteht hohen Temperaturen und Waschschritten hoher ionischer Stärke; Glas ist nicht porös, somit kann das Hybridisierungsvolumen auf ein Minimum beschränkt werden und die Ziel-Nukleinsäuren haben direkten Zugriff auf die Sonden ohne in die Poren zu diffundieren, was in einer Erhöhung der Hybridisierungseffizienz resultiert; Glas hat eine geringe Eigenfluoreszenz und trägt somit nicht übermäßig zum Hintergrund bei (*signal-to-noise-ratio*); die flächige Struktur und Transparenz der Glasoberfläche verbessert die Bildaufnahme und -verarbeitung, da die Lage der Sonden viel besser als auf einer flexiblen Membran definiert sind [159,161,162].

Neben den zweidimensionalen Biochips wurden in den letzten Jahren Microarrays entwickelt, die auf der Immobilisierung von DNA-Sonden in dreidimensionalen Substraten wie Nitrocellulose, Polyacrylamid-Gelkissen und Agarosefilmen basieren [163-166]. Einige Arbeitsgruppen beschreiben 3D-Substrate als vorteilhaft im direkten Vergleich mit der Hybridisierung auf flachen zweidimensionalen Biochips. Dabei zeigte sich, dass, obwohl die Hybridisierung auf 2D-Microarrays schneller vonstatten geht, die Gel-basierten Microarrays zwischen perfekten und nicht-perfekten Hybridisierungsduplexen effizienter unterscheiden und 5 bis 20 mal stärkere Signale und einheitlichere Daten produzieren sollen [167]. Dies soll die Folge einer höheren Anzahl potentieller Sonden-Immobilisierungsstellen im Vergleich zu modifizierten Glasoberflächen sein [164-166]. Im Einzelfall bleibt zu prüfen, ob zwei- oder

dreidimensionale Substrate höhere Signale und einheitlichere Daten hervorrufen. Die Literatur ist in dieser Fragestellung nicht eindeutig.

Auf einem Nukleinsäure-Biochip können cDNA-Sequenzen, PCR-Produkte (einige 100 bis 1000 bp lang), sowie kurze (25-30mer) oder längere (60-70mer) Oligonukleotid-Reporter aufgrund ihres Amino-Endes kovalent an epoxy-, isothiocyan- und aldehydaktivierte Glasoberflächen der Array-Träger als Fängersonde gebunden werden [168-170]. Abhängig von der Art der immobilisierten Hybridisierungssonde können Microarrays unter anderem für die Expressionsanalyse [107,143], zur Detektion verschiedener Mikroorganismen [132,171] und zur Untersuchung biochemischer und genregulatorischer Signalwege [107,142,144,148] genutzt werden (siehe auch Tabelle 5).

Für eine optimale Signalausbeute sollte eine Konzentration der cDNA- oder Oligonukleotidsonde zwischen 0,1 und 0,2 µg/µl gewählt werden [168]: dies entspricht bei einem 30mer einer Molarität von 10 bis 20 µM. Bei einer höheren Spottingkonzentration der DNA-Sonden (> 0,25 µg/µl) auf der Biochip-Oberfläche kann es zu Kometenschwänzen („Ausblutungen“) kommen, welche sich bei der Bildaufnahme an den Spots zeigen [172,173].

Die Hybridisierungsrate und somit die Signalintensität erhöht sich sowohl linear mit der Länge der gespotteten Oligonukleotide als auch mit der Sondenkonzentration [160,174]. Es wurde gezeigt, dass 60mer-Oligonukleotide eine 10-fach höhere Sensitivität haben als ein 25mer. Die Spezifität sinkt dagegen mit steigender Sondenlänge [175-179]. Neben der Länge der Sonde ist auch deren Zusammensetzung für das Hybridisierungssignal bedeutend. Sonden mit einem GC-Gehalt von < 40 % hybridisieren mit verminderten Signalintensitäten, wohingegen Sonden mit einem GC-Gehalt von > 60 % höhere Signalintensitäten zeigen [180].

Die Bindungseffizienz der Sonde ist invers abhängig von der Spotgröße [181,182]. Microarray-Spots, wie sie in den meisten kommerziellen Assays verwendet werden (Spotdurchmesser: 50-200 µm), befinden sich in der optimalen Größenspanne für einen Oberflächen-Capture-Assay bezüglich ihrer Sonden-Analyten-Fang-Effizienz [181].

Die Hybridisierungsausbeute kann durch den Einsatz von Spacern zwischen der Biochip-Oberfläche und den Oligonukleotidsonden um bis zu 2 Größenordnungen erhöht werden. Durch den Spacer werden die Basen der Sonde, welche sich am nächsten zur Oberfläche des Biochips befinden und somit schwerer für das Zielmolekül zu erreichen sind, abhängig von der Spacerlänge um bis zu 10 nm weiter in den Raum (in Richtung z-Achse) verschoben [161,175,183].

Für die Analyse der Variation zwischen verschiedenen Organismen ist es wichtig, dass der Hybridisierungsduplex aus Ziel- und Sondensequenz in der Lage ist, einen einzigen Mismatch zu unterscheiden. Mismatches, das heißt fehlgepaarte Basen zwischen Fängersonde und Amplikon, in der Mitte des Oligonukleotides haben einen stark destabilisierenden Effekt auf

den Duplex, dagegen sind Mismatches an den Enden weniger destabilisierend und somit schwieriger bei der Hybridisierung zu unterscheiden [161,184,185]. Kurze Oligonukleotidsonden sind im Vergleich zu längeren Sonden empfindlicher gegenüber Mismatches [143,186-190]. Mismatches, die über die gesamte Länge der Sonde verteilt sind, rufen mehr Destabilisierung hervor als jene, welche in einem Cluster auftreten [191]. Des Weiteren haben fehlgepaarte Basen zwischen einer 5'-immobilisierten Fängersonde und dem Zielmolekül am 5'-Ende der Sonde eine größere Signalreduktion zur Folge als Mismatches an deren 3'-Ende [184,192-194].

Faktoren, welche neben der Auswahl der Sonde die Signalintensität beeinflussen sind: die Länge und spezifische Aktivität des Zielmoleküls, die Sensitivität der Detektionsmethode (Fluoreszenz, Chemilumineszenz, Elektrochemilumineszenz, enzymatische Farbreaktion etc.), die Reaktionszeit und die allgemeinen Reaktionsbedingungen [159].

3.4.4 Leistungsfähigkeit von Microarrays

Die Leistungsfähigkeit von Microarrays wird durch die Sensitivität und Spezifität der durchgeführten Nachweise bewertet [174-176,189,190,195,196]. Die Sensitivität bezieht sich auf das Signal-Hintergrund-Verhältnis der Nachweis-Reaktion. Dabei bezeichnet ein hohes Verhältnis eine hohe Sensitivität und somit eine effektivere Detektion der beobachteten Gene (Nukleinsäure-Array) bzw. Antigene (Protein-Array). Die Spezifität eines Nukleinsäure-Arrays bezieht sich auf die Fähigkeit zwischen zwei unterschiedlichen Nukleotid-Sequenzen zu unterscheiden [190]. Die immobilisierten Sonden sollten theoretisch so ausgewählt werden, dass zwischen Target- und Nichttarget-Molekülen, die sich in nur einem Nukleotid unterscheiden (z.B. single mutations, Genpolymorphismus), differenziert werden kann. Je höher die Spezifität desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit der Kreuz-Hybridisierung und der Generierung von falsch-positiven Ergebnissen.

Verschiedene Faktoren haben einen Einfluss auf die Sensitivität und Spezifität von molekularbiologischen Microarray-Experimenten darunter die Sequenz, Länge und Konzentration der immobilisierten Sonde und der Targetsequenz. Einfluss nimmt zudem die Zusammensetzung von Sonde und Target (G-C-Gehalt), die Spacer-Länge und die Hybridisierungstemperatur [144,159].

Immunologische Microarray-Experimente weisen eine hohe Spezifität auf, wenn die immobilisierten Fänger-Antikörper nur mit dem jeweiligen spezifischen Antigen und nicht mit unspezifischen Antigenen bzw. nahe verwandten Antigenen reagieren.

3.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war der Aufbau, die Optimierung und Standardisierung eines stabilen immunologischen und molekularbiologischen Detektionsverfahrens auf Arraybasis für potentielle B-Waffen-relevante Viren. Hierzu wurde ein bereits existierendes Nachweissystem genutzt, welches von der Firma Zenteris GmbH entwickelt wurde.

Das genutzte Microarray-System mit dem Namen Approve-B® (AP®-System) erlaubt abhängig von dem auf dem Biochip immobilisierten Fängerset die unterbrechungsfreie Identifikation verschiedener Virusspezies sowohl auf immunologischem als auch auf molekularbiologischem Wege.

Im Zuge der Arbeit sollten für den immunologischen, auf einem Sandwich-ELISA basierenden Nachweis, robuste Antikörper-Sets für die Detektion von Alpha-, Flavi- und Orthopockenviren ermittelt und selektiert werden. Die individuellen Nachweisgrenzen für die einzelnen Antigene waren zu bestimmen. Zudem war die Möglichkeit der parallelen immunologischen Identifikation verschiedener Virusspezies und anderer B-Agenzien in diesem System zu analysieren und zu optimieren.

Zusätzlich galt es, für die Alpha-, Flavi- und Orthopockenviren aufgrund ihrer genetischen Information einen gruppen- und speziesspezifischen molekularbiologischen Nachweis im AP®-System aufzubauen. Der molekularbiologische Nachweis der einzelnen Viren war hinsichtlich des benutzten Reaktionsmixes, der Prozessierungsparameter, des Prozessierungsprogrammes und der Fängermoleküle zu optimieren. Wie beim immunologischen Virusnachweis sollten die einzelnen Detektionslimits für die molekularbiologische Identifikation bestimmt werden. Des Weiteren war die Durchführbarkeit von kombinierten molekularbiologischen Nachweisen von z.B. RNA- und DNA-Viren abzuklären.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Geräte

AP[®]-Prozessierungs- und Detektionseinheit

- Approve-B[®], Zenteris GmbH, Jena, D

Brutschränke

- Heraeus 6000, Heraeus Instruments, Hanau, D
- Steri-Cycle CO₂ Incubator Hepa Class 100, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

CryoContainer

- Cryo 1 °C Freezing Container (1 °C/min), Nalgene Nunc, Wiesbaden, D

Elektronenmikroskope

- Rasterelektronenmikroskop DSM 962, Carl Zeiss SMT, Oberkochen, D
- Rasterelektronenmikroskop Supra 40 VP, Carl Zeiss SMT, Oberkochen, D
- Transmissionselektronenmikroskop CEM 902, Carl Zeiss SMT, Oberkochen, D

Kühl- und -20 °C-Gefrierschränke

- WA90, Kirsch Bosch-Kältemaschinen, Heidelberg, D
- Kühlschrank abschließbar, Liebherr, Ochsenhausen, D
- Liebherr Comfort, Liebherr, Ochsenhausen, D
- Freezone Low-Energy, Zanussi, Nürnberg, D
- Arctis, AEG/Electrolux, Nürnberg, D
- Gefrierschrank abschließbar, GFL, Burgwedel, D

Gefriertruhen -80 °C

- abschließbar, GFL, Burgwedel, D

Gelelektrophorese-Systeme

- Easy-Cast Electrophoresis-System, Modell B2, Owl Scientific, Woburn, USA
- E-Gel Electrophoresis System, Invitrogen, Karlsruhe, D
- Netzgerät: Hoefer Mighty Slim SX 250 Power Supply, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA

Magnetrührer

- Reverstir Model RS-8, Toyo Kagaku Sangyo, Tokyo, J
- Ikamag Reo, IKA Labortechnik, Staufen, D
- LD-14, Labor-Brand, Gießen, D

Mikroskope

- Olympus CK2, Olympus, Hamburg, D

pH-Meter

- pH 526, WTW, Weilheim, D

Photometer

- BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, D

real-time PCR-Gerät

- DNA Engine Opticon, Bio-Rad, München, D

Schichtdicken-Messgerät für REM-Beschichtung

- MTM20, Cressington Scientific Instruments, Watford, UK

Schüttler

- AM 69 Microshaker, Dynatech AG, Zug, CH
- IKA Vibrax VXR basic, IKA Werke, Staufen, D

Sequenziergerät

- ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Darmstadt, D

Spektrophotometer

- NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, USA

Sputter-Gerät für REM-Beschichtung

- Sputter Coater 108 Auto (für Gold-Beschichtung), Cressington Scientific Instruments, Watford, UK
- Sputter Coater 208HR (für Platin-Palladium-Beschichtung), Cressington Scientific Instruments, Watford, UK

Sterilbank

- NSF 49, BS 5724, Typ: DLF/BSS6 KL 6A, Clean Air, Marseille, F

UV-Transilluminator/UV-Tisch

- Eagle Eye II, Stratagene, La Jolla, USA

Vakuumpumpe

- Typ 2.2, Charge SP221701, General Electric, München, D

Videoprinter

- Digital Monochrome Printer P93DW, Mitsubishi Electric, Ratingen, D

Vortexer

- Reax 2000, Heidolph, Schwabach, D
- Reax top, Heidolph, Schwabach, D

Waagen

- Sartorius Typ 1574, Sartorius, Göttingen, D
- Feinwaage Typ 1712, Sartorius, Göttingen, D

Wasserbad

- GFL Typ 1003, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D

Zentrifugen

- Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, D
- Mikro 12-24, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D
- Minifuge GL 4400, Heraeus Christ, Osterode, D
- Mini Spin plus, Eppendorf, Hamburg
- 6K15, Sigma Laboratory Centrifuges, Osterode am Harz, D

4.1.2 Chemikalien

2-Bromethylamin Hydrobromid ($C_2H_7Br_2N$)	Fluka Analytical, Buchs, CH
Agarose (low melting point)	Sigma-Aldrich, München, D
Antibody Stabilizer	CandorBioscience, Weißenberg, D
Asialofetuin Type I	Sigma-Aldrich, München, D
AVL-Puffer	Qiagen, Hilden, D
β-Propiolakton	Sigma-Aldrich, München, D
Biotin (long arm) NHS wasserlöslich	Alexis, Lörrach, D
Biotin Labeling Reagenz,	Pierce, Rockford, USA
Sulfo-NHS-LC-Biotin	
Blocking Solution	CandorBioscience, Weißenberg, D
Blue Juice Gel Loading Buffer 10 x	Invitrogen, Karlsruhe, D
Borsäure (H_3BO_3)	Riedel de-Haën, Seelze, D
BSA (Albumin Fraktion V)	Sigma-Aldrich, München, D
Chloramin T reinst (Trihydrat)	Merck, Darmstadt, D
DEPC	Roth, Karlsruhe, D
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)	Merck, Darmstadt, D
DMEM, Pulvermedium	Biochrom AG, Berlin, D
DMSO	Sigma-Aldrich, München, D
Dulbecco's Buffer Substance,	Serva, Heidelberg, D
ohne Ca^{2+}, Mg^{2+} und Phenolrot (PBS)	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe, D
DyLight 647 Konjugat	Pierce, Rockford, USA
DyLight 649 Konjugat	Pierce, Rockford, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, München, D
EMEM Trockenmedium	Biochrom, Berlin, D
Ethanol reinst	Riedel de-Haën, Seelze, D
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg, D
FCS (fötales Kälberserum)	Biochrom, Berlin, D
Formaldehyd-Lösung 37 % (Formalin)	J.T. Baker, Griesheim, D
GAM-Gel	Zymed, Wien, A (Invitrogen)
Glycerin	Merck, Darmstadt, D
Glycin	Serva, Heidelberg, D
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, D
Liquid Plate Sealer	CandorBioscience, Weißenberg, D
LowCross Buffer	CandorBioscience, Weißenberg, D
Magermilchpulver	Fluka Analytical, Buchs, CH
Magnesiumchlorid Hexahydrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	J.T. Baker, Griesheim, D
Methanol	Roth, Karlsruhe, D
Natriumacetat (CH_3COONa)	Riedel de-Haën, Seelze, D
Natriumazid	Merck, Darmstadt, D
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid ($NaCl$)	J.T. Baker, Griesheim, D
Natrium-Dihydrogen-Phosphat	Merck, Darmstadt, D
1-Hydrat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)	
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid ($NaOH$)	Merck, Darmstadt, D
Natriumthiosulfat ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$)	Merck, Darmstadt, D

PBS- Pulvermedium	Biochrom, Berlin, D
PBS Pulvermedium	Biochrom, Berlin, D
PCR Nucleotide Mix	Roche Diagnostics, Rotkreuz, CH
Penicillin G Natrium	Biochrom, Berlin, D
Poly-HRP Streptavidin	Pierce, Rockford, USA
Protein Assay	Bio-Rad, München, D
Ready-Load 100 bp DNA-Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, D
RPMI 1640 mit L-Glutamin ohne NaHCO ₃ , Pulvermedium	Biochrom, Berlin, D
Saccharose für Dichtegradienten- Zentrifugation	Merck, Darmstadt, D
SA-DyLight, 647 conjugated	Pierce, Rockford, USA
Sample Buffer	CandorBioscience, Weißenberg, D
Salzsäure (HCl)	J.T. Baker, Griesheim, D
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt, D
Seramun Grün	Seramun Diagnostica, Heidesee, D
Streptavidin-HRP Conjugate	GE Healthcare, München, D
TMB	Serva, Heidelberg, D
TrackIt™ 100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, D
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Serva, Heidelberg, D
Triton® X-100	Sigma-Aldrich, München, D
True Blue Peroxidase Substrat	KPL, Gaithersburg, USA
Trypsin	Serva, Heidelberg, D
Tween 20	Merck, Darmstadt, D
Versen	Biochrom, Berlin, D
Zitronensäure	Merck, Darmstadt, D

4.1.3 Kits

Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, D
DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden, D
DyLight 649 Antibody Labeling Kit	Pierce, Rockford, USA
DyLight 649 Microscale Antibody Labeling Kit	Pierce, Rockford, USA
HotStarTaq DNA Polymerase Kit	Qiagen, Hilden, D
ISO Strip (mouse monoclonal antibody isotyping kit)	Roche Diagnostics, Rotkreuz, CH
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, D
Platinum Quantitative RT-PCR Script™ One-Step System	Invitrogen, Karlsruhe, D
Phusion High Fidelity DNA Polymerase Kit	Finnzymes, Espoo, F
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
QuantiFastProbe RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, D
QuantiTect Multiplex RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, D
QuantiTect Probe RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, D
QuantiTect Virus RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, D

4.1.4 Verbrauchsmittel

Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices	Millipore, Schwalbach/Ts., D
Amicon Microcon YM-100 Centrifugal Filter Devices	Millipore, Schwalbach/Ts., D
Arbeitsplatzauflage Benchkote	Whatman, Dassel, D
Combitips 12,5ml für Multipette 4780	Eppendorf AG, Hamburg, D
DyeEx -Säulen	Qiagen, Hilden, D
E-Gel 1.2 % General Purpose Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, D
E-Gel 2 % General Purpose Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, D
Flat cap Strips	Biozym, Hess. Oldendorf, D
HiTrap Protein G HP Columns	GE Healthcare, München, D
Küvetten	VWR, Darmstadt, D
Kryo-Röhrchen	neoLab, Heidelberg, D
Mikrotiterplatten MaxiSorp	Nunc, Wiesbaden, D
Mikrotiterplatten MaxiSorp, steril	Nunc, Wiesbaden, D
Parafilm Laboratory Film	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
PCR-Mikrotiterplatten	Biozym, Hess. Oldendorf, D
PCR Thin-Wall 8-Tube Strips	Biozym, Hess. Oldendorf, D
PD-10 Desalting Columns	GE Healthcare, München, D
Petrischalen (Ø 90mm)	TPP, Trasadingen, D
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettenspitzen mit DualFilter	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettenspitzen (1,25 ml)	Matrix (Thermo Fisher Scientific), Rockford, USA
Reagent Reservoirs (25ml, 100ml)	Apogent Discoveries, Cheshire, UK
Rollerflaschen miniPERM	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Safe-Lock Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, D
serologische Pipetten	VWR, Darmstadt, D
Ultra-Clear Centrifuge Tubes	Beckman Coulter, Krefeld, D
Ultrazentrifugenröhren	Beckman Coulter, Krefeld, D
Zellkulturflaschen , 75 cm ²	Nunc, Wiesbaden, D
Zellkulturflaschen T125, 162 cm ²	Corning Inc., Corning, USA
Zellkulturschalen	Nunc, Wiesbaden, D
(6-Wells, 12-Wells, 24-Wells)	
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, D

4.1.5 Lösungen und Puffer

Immunaффinitätsaufreinigung von Antikörpern über die GAM-Säule

Bindungspuffer pH 8,7
(0,1 M Carbonatpuffer in 0,5 M NaCl)

Lösung A: 100 mM NaHCO₃
500 mM NaCl

Lösung B: 100 mM Na₂CO₃
500 mM NaCl

→ Lösung A vorlegen und mit Lösung B auf pH 8,7 einstellen

Elutionspuffer pH 2,3
(0,1 M Glycinpuffer in 0,5 M NaCl)

100 mM Glycin
500 mM NaCl

→ Lösung vorlegen und mit 1M HCl auf pH 2,3 einstellen

PD 10-Puffer pH 8,5
(0,1 M Carbonatpuffer)

Lösung A: 100 mM NaHCO₃
Lösung B: 100 mM Na₂CO₃

→ Lösung A vorlegen und mit Lösung B auf pH 8,5 einstellen

Phosphatpuffer pH 7,2
(0,02 M Phosphatpuffer)

Lösung A: 20 mM Na₂HPO₄ · 2H₂O
Lösung B: 20 mM KH₂PO₄

→ Lösung A vorlegen und mit Lösung B auf pH 7,2 einstellen

ELISA

PBS (mit Mg²⁺ und Ca²⁺) pH 7,4

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
8,1 mM Na₂HPO₄
1,5 mM KH₂PO₄
0,5 mM MgCl₂ · 6H₂O
0,7 mM CaCl₂

PBS- (ohne Mg²⁺ und Ca²⁺) pH 7,4

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
8,1 mM Na₂HPO₄
1,5 mM KH₂PO₄

PBS-F

PBS- mit 1 % FCS

PBS-T

PBS- mit 0,01 % Tween

PBS-FT

PBS-T mit 1 % FCS

TMB

100 mg in 10 ml DMSO

TMB-Substrat

10 ml A. dest
9,9 ml 0,2 M Na-Acetat-Lösung
100 µl 0,2 M Zitronensäure-Lösung
200 µl TMB
2,4 µl H₂O₂

Abstoppen der Reaktion

2 M H₂SO₄

PCR*DEPC-Wasser*

100 µl DEPC in 1 l dH₂O
nach Inkubation über Nacht DEPC
durch Autoklavieren inaktivieren

TE-Puffer

1 mM EDTA pH 8,0
10 mM Tris-Base pH 7,4
in DEPC-Wasser

20 x SSC-Puffer

3 M NaCl
0,3 M Na-Citrat

Gelelektrophorese*10 x TBE-Puffer pH 8,0*

0,89 M Tris-Base
0,89 M Borsäure
0,02 M EDTA pH 8,0

Zellkultur*Hybridomazell-Medium*

RPMI oder RPMI/DMEM (1:1)

Medium für BHK-Zellen

EMEM

Medium für PS-Zellen

EMEM

Medium für Vero-Zellen

RPMI/DMEM

Alle Medien wurden mit 10 % FCS und 0,1 % Penicillin/Streptomycin angesetzt.

Penicillin/Streptomycin-Lösung

100 U/ml Penicillin
100 µg Streptomycin/ml

PBS-V

0,05 % Versen in PBS-

Trypsin

1 % Trypsin in PBS- (Stammlsg.)
0,25 % in PBS-V (Gebrauchslsg.)

Virusanzucht und -inaktivierung*0,1 M Carbonatpuffer für BPL-Inaktivierung*100 mM Na₂CO₃*0,4 M Bromethylamin-Hydrobromid (BEA-HBr)*

82 mg BEA-HBr in 1 ml A. dest
portioniert bei -20 °C lagern

0,2 M β-Ethylenimin (BEI) pH 8,5

0,4 M BEA-HBr 1:1 mit
0,35 M NaOH-Lösung mischen
Inkubation 1 h bei 37 °C

0,35 M NaOH-Lösung

0,14 g in 10 ml A. dest

1 M Na₂S₂O₃ · 5H₂O

2,48 g in 10 ml A. dest

Formalin-Lösung zur Fixierung von Zellen

Stocklösung: 37 % Formaldehyd
in H₂O mit 10 % Methanol
einsetzen: 2,5 % der Stocklösung

4.1.6 Antikörper

Tabelle 6: Verwendete Fänger- und Nachweis-Antikörper und -Moleküle im AP®-System

Antikörper	Antigen	Art (Spezies)	verwendet als ¹	Verdünnung/ Konzentration auf dem Biochip	Herkunft ²
<u>virale Antikörper</u>					
Alphaviren					
P100	PIXV	mAk (Maus)	F-Ak	0,5 mg/ml	WIS
V100	VEEV	mAk (Maus)	F-Ak	0,5 mg/ml	WIS
V101	VEEV	mAk (Maus)	F-Ak		WIS
V102	VEEV	mAk (Maus)	F-Ak	0,5 mg/ml	WIS
V103	WEEV	mAk (Maus)	F-Ak	0,5 mg/ml	Chemicon (MAB8742)
V104	VEEV	mAk (Maus)	F-Ak	0,5 mg/ml	Chemicon (MAB8747)
V105	VEEV	mAk (Maus)	F-Ak	0,5 mg/ml	Chemicon (MAB8767)
V109	VEEV	mAk (Maus)	F-Ak NW-Ak	0,5 mg/ml 1:100	WIS
V110	VEEV	mAk (Maus)	F-Ak	0,5 mg/ml	WIS
V-Mix (V100, V101, V102)	CHIKV, EEEV, VEEV, WEEV	mAk (Maus)	F-Ak	0,5 mg/ml	WIS
Flaviviren					
F100	Flaviviren	mAk (Maus)	F-Ak NW-Ak	0,5 mg/ml 1:100	WIS
F101	Denguevirus 4	mAk (Maus)	F-Ak NW-Ak	0,5 mg/ml 1:100	WIS
F102	Denguevirus 1	mAk (Maus)	F-Ak	0,5 mg/ml	WIS
F104	Denguevirus 3	mAk (Maus)	F-Ak NW-Ak	0,5 mg/ml 1:100	WIS
F105	Dengueviren 1-4	mAk (Maus)	F-Ak NW-Ak	0,5 mg/ml 1:50	WIS

¹ F – Fänger-Molekül; F-Ak – Fänger-Antikörper; NW-Ak – Nachweis-Antikörper

² WIS – WIS eigener durch Hybridomazelllinie produzierter monoklonaler Antikörper

Orthopockenviren

O100	OPV	mAk (Maus)	F-Ak	0,5 mg/ml	WIS
O101	OPV	mAk (Maus)	F-Ak NW-Ak	0,5 mg/ml 1:100	WIS

Bakterielle Antikörper

E1	<i>E.coli</i> EHEC O157:H7	pAk (Ziege)	F-Ak	0,5 mg/ml	KPL (Cat.#: 01-95-90)
E2	<i>E.coli</i>	pAk (Kaninchen)	NW-Ak	1:200	Biotrend (Cat.#: BT43-2949-11)

Toxin-Antikörper und Nachweis-Moleküle

B12	BoNT/A	pAk (Kaninchen)	F-Ak	0,5 mg/ml	Metabionics (rabbit anti-A)
B100	BoNT/A	pAk	F-Ak	0,5 mg/ml	NVA/WIS
R1	Ricin	mAk (Maus)	NW-Ak	1:100	WIS
R2	Ricin	mAk (Maus)	F-Ak	0,5 mg/ml	WIS
AF	Ricin	Lektin	F	0,5 mg/ml	Sigma
S9	SEB	mAk (Maus)	NW-Ak	1:250	Hytest/ Senova (2S4)
S12	SEB	pAk (Kaninchen)	F-Ak	0,5 mg/ml	Sigma (S9008)
S100	SEB	pAk (Kaninchen)	F-AK	0,5 mg/ml	Toxin Techn. (SLBI202)

4.1.7 Primer und TaqMan-Sonden für die RT-PCR bzw. PCR

Tabelle 7: Bei der rt RT-PCR und rt PCR verwendete Primer und TaqMan-Sonden

Assay	Primer / TaqMan-Sonde ³	Sequenz (5'→3')	Accession-Nr.	Amplikon
EEEV_E1	EEE101_E1 (+)	atcagggtgtgcagttattaaaga	EF568607	101 bp
	EEE105_E1 (S)	6FAM-tggatcatttacattccacttctccactgc-TMR		
	EEE103_E1 (-)	gcttaaaagcaggatggatg		
EEEV_E2	EEE104_E2 (+)	cataaggtagaattcaggcca	EF568607	106 bp
	EEE102_E2 (S)	6FAM-tggtagagagaaataccgtcacccac-TMR		
	EEE106_E2 (-)	cttggtctgcacgcttgt		
VEEV_E1	VEE109_E1 (+)	aaatctgacgactgccttg	L01443	131 bp
	VEE110_E1 (S)	6FAM-tcagtgcaggcggttctcaacatcac-TMR		
	VEE111_E1 (-)	ggagtttctccattcacatac		
VEEV_E2	VEE112_E2 (+)	gtcactgaaactgcaccc	L01443	182 bp
	VEE113_E2 (S)	6FAM-cacgcacgagctcatatctgaacc-TMR		
	VEE114_E2.2 (-)	ctgtttctgtgccccaaa		
WEEV_E1	WEE101_E1 (+)	gtcggcctgcgtatagtata	AF229608	139 bp
	WEE101_E1.2 (+)	gttcacacagctgctctga		160 bp
	WEE101_E1.3 (+)	tcacacagctgctctgaaagt		158 bp
	WEE102_E1 (S)	6FAM-cggcctgcgtatagtatacggca-TMR		
	WEE103_E1 (-)	ccttatggtcaaagggtga		
WEEV_E2	WEE104_E2 (+)	ggagtactgttcccacc	AF229608	173 bp
	WEE105_E2 (S)	6FAM-ggaagcgtcaggcgaagtgtac-TMR		
	WEE106_E2 (-)	tcttgccagaagggtgtt		
WNV [197]	WN1b_up (+)	agaccacgctacggcg	EU081844	102 bp
	WN_P1 (S)	6FAM-ctgcggagagtgcagtctcgat-TMR		
	WN2_down (-)	ctaggccgcgtggg		
	WN2.2_down (-)	gctatggccgcgtggg		103 bp

³ (+) forward Primer; (S) TaqMan-Sonde; (-) reverse Primer

YFV [198]	YFS (+)	aatcgagttgctaggcaataaacac	X03700	103 bp
	YFP_neu (S)	6FAM–atcggtcgttgagcgattagcagagaaytgac–TMR		
	YFA (–)	tccctgagctttacgaccaga		
OPV	KDA_upV3 (+)	cagagatatcatagccgctct	AY299020	145 bp
	OPV_P3 (S)	6FAM–agtgtgttaaacgcaacgatgaagttct–TMR		
	KDA_downV3 (–)	acaacggctaactaattggaa		

4.1.8 Hybridisierungs sonden für die DNA-Arrays

Tabelle 8: Für die DNA-Arrays etablierte Fängersonden

Nachweis von	Fängersonde	Sequenz (5'→3')	Accession-Nr.
EEEEV_E1	EEEEV_F1	ggatcatttacattccacttctccactgc	EF568607
	EEEEV_F2	gcggatcatttacattccacttctccact	EF568607
	EEEEV_F3	gagcggatcatttacattccacttctccact	EF568607
	EEEEV_F4	gagagcggatcatttacattccacttctccact	EF568607
	EEEEV_F5	ctgagagcggatcatttacattccacttctcca	EF568607
EEEEV_E2	EEEEV_F6	ggtagagagaaataccgtcaccac	EF568607
	EEEEV_F7	gtagagagaaataccgtcaccacactgaa	EF568607
	EEEEV_F8	aataccgtcaccacactgaacatggaga	EF568607
	EEEEV_F9	gaaataccgtcaccacactgaacatggaga	EF568607
VEEV_E1	E1_V1	gggaacactctattgtgaccaccgtg	U55342
	E1_V2	gggagaacattccatcgtgaccacc	L00930
	E1_V3	gggagaacactctattgtgactaccgtg	L01443
	E1_V4	gggagaacactccattgtgtgaccactg	U55360
	E1_cons_iab_ic_id	tcagtgcaggcgttcctcaacatcac	Consensus-Sequenz der VEEV IAB-, IC- und ID-Subtypen
	E1_cons_iab_ic_id_n1	gtgacyaccgtgtatgtgaatggag	
	E1_cons_iab_ic_id_n2	accgtgtatgtgaatggagaaactcc	
	E1_cons_iab_ic_id_n3	agcctcagtgcaggcgttcctcaacatca	
	cons_veev_ic_E1	ggrgaacactcyattgtgaccacygtg	Consensus-Sequenz der VEEV IC-Subtypen
	cons_veev_id_E1	ggagaacattccatcgtgaccaccgtg	Consensus-Sequenz der VEEV ID-Subtypen

VEEV_E2	E2_V1	taagaatcccacatatctgaccactcgcc	U55342
	E2_V2	caagaatcccacatatctgactacccgc	L00930
	E2_V3	ctaagaatcccacatatctaaccacccgcc	L01443
	E2_V5	taagaatcccacatatctaaccacccgcc	L01442
	E2_V6	caagaatcccacatatctgacaacccgc	DQ390224
	E1_V7	cctaagaatcccacatatctgaccactcgcc	AF004459
	E2_cons_iab_ic_id	cacgcacgagctcatatctgaacc	Consensus-Sequenz der VEEV IAB-, IC- und ID-Subtypen
	E2_cons_iab_ic_id_n1	cgccgaaaagggtttgggcacaggaaa	
	E2_cons_iab_ic_id_n2	ggrtgggagttgtatggggwaacca	
	cons_veev_iab_ic_id_E2	tgatggggiaaccaiccgccgaaaa	
	cons_veev_iab_E2	tgatggggaaaccacccgccgaaaa	Consensus-Sequenz der VEEV IAB- Subtypen
WEEV_E1	E1_W1	agcgcgcctggatacttcgtcaac	DQ432026
	E1_W2	cggtacctggatacgttcgtcaatgg	AF229608
	E1_W3	cggcacacctggatacgttcgtcaat	DQ393791
	E1_W4	cggcacacctggatacgtttgtcaatg	NC_003908
	E1_W5	taccaccgcgcacacctggatacgttt	DQ393793
	W1_W6	cggcacacctggatgcgttcgtcaat	DQ432027
	E1_cons_weev	cggcctgcgtatagtatacggca	Consensus-Sequenz der WEEV-Subtypen
	E1_cons_weev_n1	tgaaggcatagcagggccgatcagc	
	E1_cons_weev_n2	cgatatcagchgttttacccttgacc	
	cons_weev_E1_n3	cagggccgatatacgcigcttttcac	
	cons_weev_E1_n4	aggttcctcacgggacctgaaggt	
WEEV_E2	E2_W2	tgtccatggaaagagggtaaagtgccacgt	AF229608
	E2_W3	tgtccatggaaagctggttaaagtgccacgt	DQ393791
	E2_W4	cccgtccatggaaagctggttaaagtg	NC_003908
	E2_W7	cccgtcctggaaagctggttaaagtg	DQ393794
	E2_W8	ctgtccatggaaagctgttaaagtgccaca	DQ393790
	E2_cons_weev	ggaagcgtcaggcgaagtgtac	Consensus-Sequenz der WEEV-Subtypen
	E2_cons_weev_n1	gtcaggcgaagtgtacattaaaccacctc	
	cons_weev_E2_n2	aggaagcgtcaggcgaagtgtacatt	

WNV	WNV_F1	actctgctggagagtgagctctgctgtagtg	EU249803
	WNV_F2	actctgctggagagtgagctctgctgtag	EU249803
	WNV_F3	tctgctgtagtgccccaggtggactg	EU081844
	WNV_F4	ccaggtggactgggttaacaaaggcaa	M12294
	WNV_F5	gccccaggtggactgggttaacaaaggcaa	M12294
	WNV_F6	tctgctgtagtgccccaggaggact	EU081844
	WNV_F7	cccaggaggactgggttaacaaaggca	EU081844
	WNV_F8	atcaacgccccacgcggcccta	EU081844
	WNV_F9	gactgggttaacaaaggcagatcaacgc	EU081844
YFV	YFP_neu	atcggtcgtgagcgattagcagagaaytgac	X03700
	YFV_5'UTR_V1	gagttgctaggcaataaacacatttga	X03700
	YFV_5'UTR_V2	ckttgagcgattagcagaaytgaccag	X03700
	YFP_neu2	gcgattagcagagaactgaccagaacatg	X03700
	YFP_neu3	accagaacatgtctggtcgttaaagctc	X03700
OPV	Pox_F1	gagataatcatagccgctcttagagtttcagc	DQ121394
	Pox_F2	agccgctcttagagtttcagcgtgattttc	DQ121394
	Pox_F3	cgctcttagagtttcagcgtgattttcca	DQ121394
	Pox_F4	agagtttcagcgtgattttccaacctta	DQ121394
	Pox_F5	ccaacctaaatagaacttcacgttgct	DQ121394
	Pox_F6	cctaaatagaacttcacgttgctttacaacac	DQ121394
	Pox_F7	cctaaatagaacgtcatcattgcgtttacaacac	X69198

4.1.9 Das Approve-B[®] System

Das Array-Processor-System Approve-B[®] (AP[®]-System) besteht aus einem in eine AP[®]-Kartusche integrierten Biochip und der AP[®]-Prozessierungs- und Detektionseinheit (Abbildung 4a) mit dem Steuerrechner und der Analysesoftware PocLab2. In diesem geschlossenen System finden die gesamten für die Analyse notwendigen Inkubationsschritte sowie die Bildaufnahme und die anschließende Auswertung des Reaktionssignals ohne weiteres Eingreifen des Anwenders statt.

4.1.9.1 Aufbau der AP[®]-Kartusche

Die AP[®]-Kartusche besteht aus folgenden Komponenten (Abbildung 4b und c):

- Kanülensystem für das Befüllen der Kartusche
- DataMatrix-Code für die eindeutige maschinelle Identifizierung der Kartusche
- Biochip in einem durch Silikondichtungen vollständig abgeschlossenen Reaktionsraum
- Halbleiterelement für die Messung und Regelung eines definierten Temperaturprofils im Reaktionsraum

Der Probenraum besteht aus einem schwarzchrom-beschichteten Glaschip als Grundfläche, auf dem nach einer Epoxy-Aktivierung die Hybridisierungssonden bzw. Fänger-Moleküle als Array aufgebracht sind, und einem optischen Glasfenster als Abdeckung (Abbildung 4c). Dazwischen befindet sich eine Silikondichtung, die den Probenraum seitlich abdichtet. Zwei Kunststoffhalbschalen bilden die Außenkonstruktion der Kartusche. Innerhalb des Biochips befindet sich ein Halbleiterelement, welches zur Regulation der Temperatur in der Kartusche benötigt wird. Die Kontaktierung mit dem Reader und somit die Übertragung des Prozessierungsprotokolls auf den Microarray erfolgt über eine kleine Leiterplatte (Abbildung 4b).

Die Injektion des Reaktionsansatzes in die Kartusche erfolgt über ein Kanülensystem. Dabei wird die Silikondichtung mit einer Kanüle durchstoßen, während die im Probenraum durch den Reaktionsansatz verdrängte Luft durch eine zweite Kanüle entweichen kann. Nach der Injektion der Probe und dem Entfernen beider Kanülen aus dem Reaktionsraum verbleibt dieser für die Analyse vollkommen dicht. Der immunologische oder molekularbiologische Nachweis läuft ohne zusätzlichen Flüssigkeitsaustausch ab, nach der Injektion der Probe erfolgt deren Prozessierung und Analyse automatisiert.

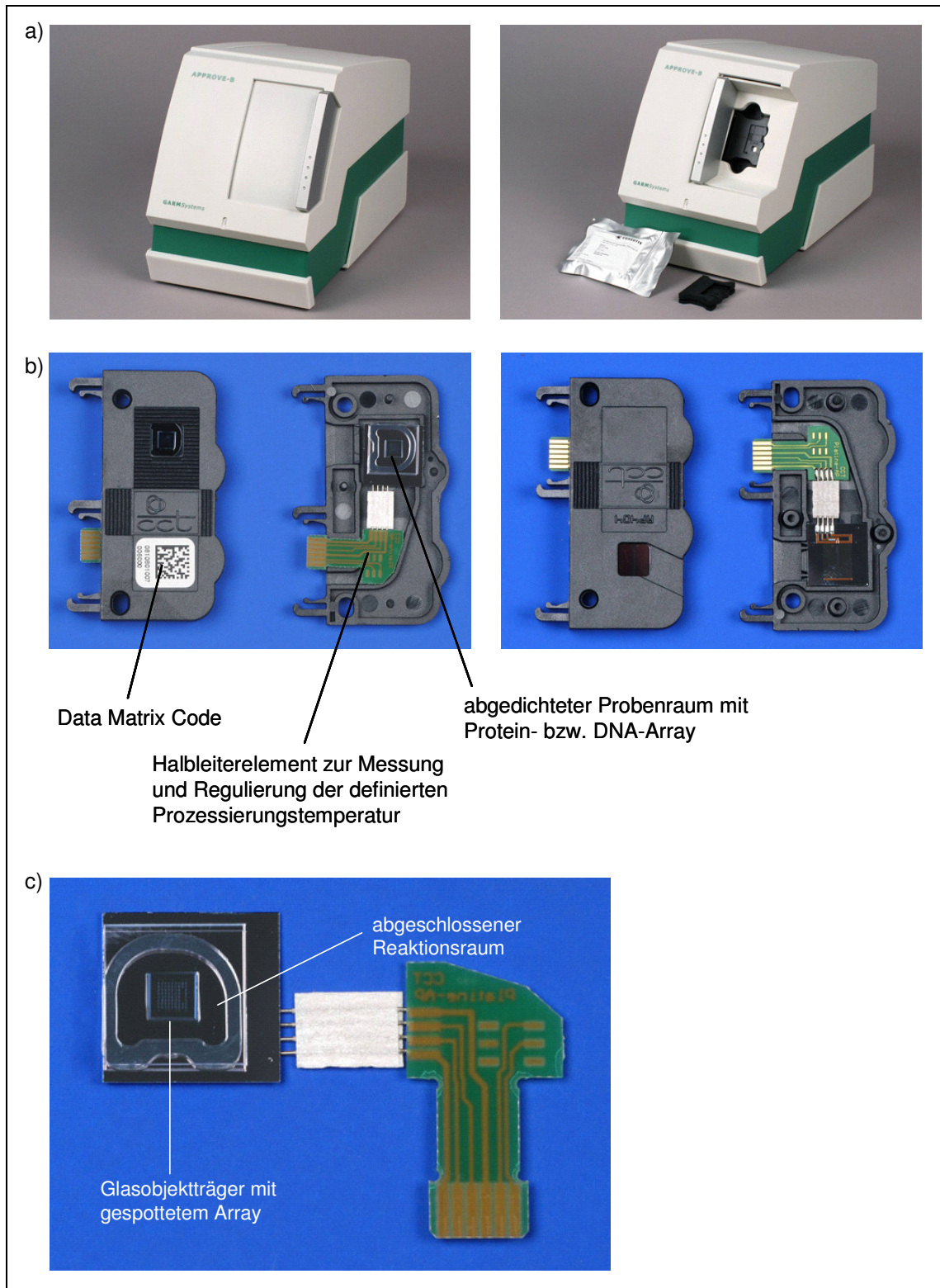


Abbildung 4: Übersicht über die funktionellen Komponenten des AP®-Systems

a) AP®-Prozessierungseinheit mit geschlossener Tür bzw. geöffneter Tür und eingelegter AP®-Kartusche; b) Funktionelle Komponenten der AP®-Kartusche mit Halbleiterelement und Probenraum; c) Abgeschlossener Reaktionsraum mit integriertem Biochip

4.1.9.2 Spotting der Biochips für die AP[®]-Kartuschen

Die Antikörper und Nukleinsäuren für die AP[®]-Kartuschen wurden durch die Firma Scienion (Berlin, D) auf eine epoxymodifizierte und auf der Rückseite schwarzchrom-beschichtete Glasoberfläche gespottet. Die Bindung an den Biochip erfolgte kovalent über die primären Amine der Antikörper. Die Oligonukleotidsonden wurden über einen NH₂-modifizierten C7-Spacer an ihrem 3'-Ende an den Biochip gebunden. Die Antikörper-Endkonzentration für das Spotting betrug 0,5 mg/ml in 1 x PBS + 20 mM Trehalose und die der Nukleinsäure-Sonden 16,7 µM in 1 x TE-Puffer. Pro Spot wurden ca. 250 pl Spotting-Lösung mittels piezo-basiertem Spotting auf den Biochip gegeben. Die Spotdurchmesser betrugen ca. 100 µm mit einem Zwischenspotabstand von 100 µm. Jedes Fänger-Molekül wurde in mehreren Replikaten auf dem Biochip immobilisiert. Als Marker für die Orientierung der Auswertesoftware wurden sowohl bei den Antikörper- als auch bei den Nukleinsäure-Kartuschen Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide genutzt.

4.1.9.3 Die Approve-B[®] Prozessierungs- und Detektionseinheit

Die Prozessierung des Microarrays, das optische Auslesen und die anschließende Analyse und Zuordnung der erhaltenen Signale in der AP[®]-Kartusche erfolgte mittels AP[®]-Reader und dem Steuerrechner. Über den DataMatrix-Code findet die Auslesung des Kartuschen-Etikettes statt. Mit dem Steuerrechner kann ein definiertes Temperaturprofil ähnlich dem Programm eines PCR-Cyclers erstellt werden. Die Temperaturspanne liegt dabei zwischen 0°C und 100°C, die Kühlung erfolgt über eine Luftkühlung. Das Temperaturprofil wird über das Halbleiterelement an die Leiterplatte weitergeleitet, somit können die vorher definierten Temperaturschritte in direkter Nähe des Biochips und des Reaktionsmixes ablaufen (Abbildung 4c).

Für das optische Auslesen des Fluoreszenzsignals wird zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz der Glaschip durch einen Stempel an das optische Fenster gedrückt, um die überschüssige fluoreszierende Flüssigkeit des Reaktionsansatzes aus der Kartusche zu entfernen (Abbildung 5). Dies führt zu einer Reduktion der Hintergrundsignale und zu einer verbesserten Darstellung der Bindungsereignisse an die Fänger-Moleküle innerhalb der Kartusche. Dieses Prinzip der Kartuschen-Auslesung wurde durch die Firma Zenteris GmbH patentiert. Die Bildaufnahme der durch eine rote LED angeregten Fluoreszenz erfolgt mit einer CCD-Kamera. Die Belichtungszeit der Kamera kann variiert werden, um sicherzustellen, dass sowohl starke als auch schwache Signale detektiert werden können.

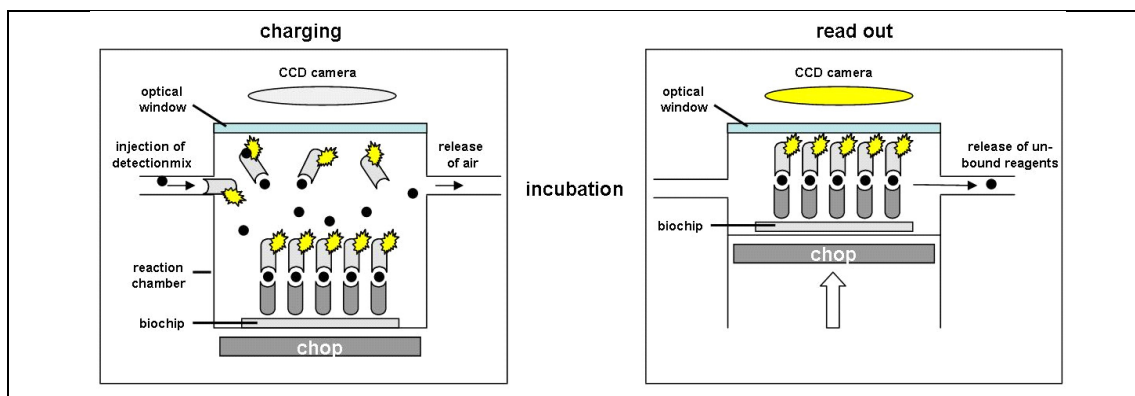


Abbildung 5: Modell der Bildauslesung der AP®-Kartusche

Innerhalb des abgeschlossenen Reaktionsraumes der AP®-Kartusche erfolgt die Bindung der zu detektierenden Moleküle (Antigene bzw. PCR-Amplifikate) an die Fänger-Moleküle (Fänger-Antikörper bzw. Hybridisierungssonden). Die Reaktion ist in der Abbildung in Form eines immunologischen Sandwich-ELISAs dargestellt (links). Bei der Bildaufnahme kommt es durch eine vorgelagerte Stößel-Reaktion zu einer Kompression des Reaktionsraumes (rechts). Dabei wird überschüssige fluoreszierende Flüssigkeit mit sämtlichen ungebundenen Molekülen aus dem Kartuschenraum entfernt (Bild mit freundlicher Genehmigung von Dr. Tanja Schreiber, Robert-Koch Institut, Berlin, verwendet).

4.1.9.4 Die Approve-B® Auswertesoftware PocLab2

Das von der CCD-Kamera aufgenommene Bild wird automatisch durch die Auswertesoftware PocLab2 verarbeitet. Über den DataMatrix-Code auf der Kartusche wird dieser ein arrayspezifisches Layout zugeordnet und die Analysevorschrift für die Spots auf dem Chip geladen. Anhand des Layouts und der auf dem Biochip gespotteten Fluoreszenz-Marker erfolgt ein Alignment, bei dem die reale Lage der Spots auf dem Biochip mit dem abgespeicherten Layout abgeglichen wird.

Für die Auswertung der AP®-Ergebnisse der Virusnachweise wurden – wenn nicht anders angegeben – die spezifischen Signalintensitäten (Difference Median) in Form des Medians und der Standardabweichung aus einer AP®-Kartusche dargestellt. Nach der Bildaufnahme im AP®-System wurden die einzelnen Spots des Biochips abhängig von deren Größe automatisch in bis zu 2000 Pixel gerastert. Jedem Pixel kann ein Wert hinsichtlich seiner Helligkeit zugeordnet werden. Diese kann maximal einen Wert von 1024 betragen, welcher in der Auswertung mit einer Signalintensität von 1 übersetzt wird. Das Auswerteprogramm berechnet aus den Pixeln der Spots identischer Fänger-Moleküle den Median und die Standardabweichung. Der Median hat im Vergleich zum arithmetischen Mittel den Vorteil, dass er sich robuster gegenüber Ausreißern verhält. Aus dem Median der gemessenen Signalintensität (Intensity Median Norm) wird zusätzlich der Signalhintergrund (Background Median Norm) herausgerechnet, so dass die angegebene Signalintensität (Difference Median Norm) nur die durch den spezifischen Nachweis hervorgerufenen Ergebnisse widerspiegelt.

4.2 Methoden

4.2.1 Zellbiologische Methoden

4.2.1.1 Verwendete Zelllinien

Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 4 – 5 % CO₂ und 80 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Tabelle 9: Verwendete Zellen, ihre Charakteristika, Medien und Verwendung

Zellen	Spezies/Ursprung	Morphologie	Medium	zur Anzucht von
BHK-Zellen	Baby-Hamster-Nierenzellen	fibroblast	EMEM mit 10 % FCS und 0,1 % Penicillin/Streptomycin	Vaccinia-Virus M1 bzw. Elstree B5
PS-Zellen	Schweine-Nieren-Zellen	epithelial	EMEM mit 10 % FCS und 0,1 % Penicillin/Streptomycin	Gelbfieber-Virus, West-Nil Virus
Vero-Zellen (TiHo Hannover)	Affennierenzellen (grüne Meerkatze)	epithelial	RPMI/DMEM mit 10 % FCS und 0,1 % Penicillin/Streptomycin	Alphaviren (CHIKV, EEEV, VEEV, WEEV)
Vero 76- bzw. B4-Zellen	Affennierenzellen (grüne Meerkatze)	epithelial	DMEM bzw. EMEM mit 10 % FCS und 0,1 % Penicillin/Streptomycin	Dengueviren
Hybridoma-Zellen	Humane myeloide lymphatische Zellen	lymphoblast	RPMI/DMEM mit 10 % FCS und 0,1 % Penicillin/Streptomycin	

4.2.1.2 Passagieren von Zelllinien

Adhärente Zellen (Vero-, PS- und BHK-Zellen) wurden wenn nötig bis zum Erreichen einer 80 – 90 %igen Konfluenz alle 2 bis 3 Tage mit frischem Medium versetzt. Zum Ablösen der Zellen von der Zellkulturschale wurde das verbrauchte Medium abgenommen und der Monolayer einmal vorsichtig mit PBS-Versen (PBS-V) gewaschen. Das im PBS enthaltene Versen unterstützt die Ablösung der einzelnen Zellmembranen voneinander und vorhandene Serumbestandteile, die inhibitorisch auf das Trypsin wirken könnten, werden durch diesen Spülschritt entfernt. Nach einem weiteren Waschschriff mit 5 ml 0,25 % Trypsin erfolgte die Ablösung der Zellen von der Zellkulturflasche mit 2 ml 0,25 % Trypsin im Brutschrank bei 37°C. Abhängig vom Zelltyp wurde das Trypsin nach einer ein- bis 20-minütigen Inkubationszeit durch die Zugabe von 3 ml Medium inaktiviert und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig vereinzelt. Ein Zehntel der Zellsuspension wurde zur weiteren Kultur in eine T125-Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt. Für eine Virusinfektion am nächsten Tag wurde die Hälfte der Zellsuspension eingesetzt, da man hierfür einen fast 100 % konfluenten Zellrasen benötigt.

4.2.1.3 Hybridoma-Zellkultur

Die aus dem flüssigen Stickstoff entnommenen Hybridomazellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in Medium (RPMI, 20 % FCS, 0,1 % Penicillin/Streptomycin) resuspendiert. Nach einem 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 150 x g wurde das Pellet in 15 ml Medium, dem 2 % Opticlone hinzugefügt wurde, gelöst und in eine 10 cm Petrischale geben. Sechs Stunden nach dem Einsäen der Hybridomazellen wurden diese in eine große Zellkulturflasche überführt und mit Opticlone versetztem Medium aufgefüllt.

Die Weiterkultivierung der Hybridomazellen erfolgte in RPMI mit 10 % FCS. Gut wachsende Zellen zeigten nach ca. 4 Tagen einen messbaren Antikörpertiter. Dieser wurde auf fixierten virusinfizierten Zellen ausgetestet. Bei einem zu schnellen Zellwachstum wurden die Zellen auf eine 1:1 Mischung aus RPMI- und DMEM-Medium mit 5 bis 10 % FCS und 0,1 % Penicillin/Streptomycin umgestellt.

Die Ernte des Zellkulturüberstandes (ZKÜ) mit den darin enthaltenen IgG-Antikörpern erfolgte ein- bis zweimal wöchentlich. Der ZKÜ wurde zur Entfernung von Zellresten vor der Aufreinigung bei 2500 x g für 15 Minuten abzentrifugiert und zur Konservierung mit 0,05 % NaN_3 versetzt.

Hybridomazelllinien wurden – wenn möglich – auf Vorrat in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dafür wurden die Zellen einer dichtgewachsenen Zellkultur bei 150 x g für 10 min abzentrifugiert und das Pellet in einem kleinen Volumen (3 bis 5 ml) RPMI mit 20 % FCS resuspendiert. Die Zellen wurden in RPMI-Medium mit 20 % FCS, welchem 7,5 % DMSO zugesetzt wurde, auf eine Zellzahl von $1 \times 10^7/\text{ml}$ eingestellt. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in ein Cryoröhrchen überführt und dann in einem mit Isopropanol gefüllten CryoContainer bei -80°C gelagert. Nach 1 bis 2 Tagen wurden die Cryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt. Das Einfrieren und Auftauen adhärenter Zellen erfolgte entsprechend der für die Hybridomazellen beschriebenen Methode.

4.2.2 Virologische Methoden

4.2.2.1 Verwendete Virusstämme

Die verwendeten Virusstämme (Tabelle 10) stammen aus der WIS-Stammsammlung und wurden inaktiviert vom Biologischen Zentrallabor, Abteilung Virologie, zur Verfügung gestellt.

Tabelle 10: Verwendete Virusstämme für den immunologischen Nachweis inklusive Angaben über Inaktivierung und Titer

Virus	Risikogruppe (aktiv)	Datum der Inaktivierung	Inaktivierung	KID ₅₀ /ml
<u>Alphaviren</u>				
CHIKV	3	23.11.05	β-PL	7,1 x 10 ⁶
EEEV	3	18.05.06	β-PL	1 x 10 ¹¹
		06.12.06	BEI	4 x 10 ⁸
		11.01.07	β-PL	7,1 x 10 ⁹
VEEV TC-83	3	26.06.00	β-PL	7,1 x 10 ⁸
		08.02.05	β-PL	7,1 x 10 ⁷
		21.09.05	β-PL	1,3 x 10 ⁹
		30.08.06	β-PL	4 x 10 ⁸
		21.06.07	β-PL	4 x 10 ⁹
		21.02.08	β-PL	2,2 x 10 ⁹
WEEV	3	23.11.05	β-PL	4 x 10 ⁷
		21.04.06	k. A.	1 x 10 ¹¹
<u>Flaviviren</u>				
DenV 1 CH 231	3	23.10.07	BEI	7,1 x 10 ⁶
DenV 3 19/80	3	23.08.07	BEI	7,1 x 10 ⁶
DenV 4 88/1/03	3	07.08.07	BEI	1,3 x 10 ⁷
WNV New York	3	26.03.03	β-PL	1,3 x 10 ⁴
YFV 17D	3	11.01.06	β-PL	1,3 x 10 ⁸
<u>Orthopockenviren</u>				
Affenpocken-Virus	3	30.08.06	β-PL	1,3 x 10 ⁵
Kuhpocken-Virus	2	17.04.07	β-PL	2,2 x 10 ⁶
Vaccinia-Virus (Vac M1)	2	22.01.03	β-PL	1 x 10 ⁶
Vaccinia-Virus Elstree Lister B5	2	12.06.06	β-PL	1 x 10 ⁸

4.2.2.2 Virusanzucht und -ernte

Aus Tabelle 9 kann die entsprechende susceptible Zelllinie für die Anzucht verschiedener Virusgattungen entnommen werden. Auf den zu 80 – 90 % konfluenten, adhärennten Zellrasen wurden pro T125-Flasche 500 bis 1000 µl des anzuziehenden Virus gegeben und alle Zellen durch Hin- und Herschwenken benetzt. Nach 30 Minuten erfolgte die Zugabe von 30 ml Zellkulturmedium zu den Zellen. Abhängig vom Virus und der MOI (*multiplicity of infection*) wurden die Viren auf den Zellen 1 bis 8 Tage im Brutschrank bebrütet. Die Ernte der Viren erfolgte am Tag mit dem höchsten Virustiter. Erfahrungsgemäß können Alphaviren 24 Stunden nach der Infektion geerntet werden, Orthopockenviren nach 3 bis 4 und Flaviviren nach 4 bis 8 Tagen.

Für die Ernte der Virussuspension wurde der Zellkulturüberstand von den virusinfizierten Zellen abgenommen und 20 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert, um enthaltene Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand mit dem aktiven Virusmaterial wurde nach der Virustiter-Bestimmung nach Spearman-Kärber [199,200] in 1 ml Aliquots bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

4.2.2.3 Titerbestimmung nach Spearman und Kärber

Die Bestimmung des Virustiters erfolgte mittels Virustitration auf BHK- bzw. Vero-Zellen in einer Mikrotiterplatte. Dafür wurden 1×10^4 Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte gegeben und im Brutschrank kultiviert. Am Folgetag wurden je 25 µl einer Verdünnungsreihe (10^{-1} bis 10^{-10}) des zu titrierenden Virus auf die konfluent bewachsene Mikrotiterplatte in 4-fach-Bestimmungen aufgebracht. Nach 30 Minuten Inkubation im Brutschrank wurde je 25 µl Medium zu den Zellen gegeben. Nach einem Tag Kultur konnte anhand der Auswertung des cytopathischen Effektes (CPE) der Titer bestimmt werden. Die Berechnung erfolgte nach der Spearman-Kärber-Methode [199,200]. Die Formel zur Berechnung der Kultur infektiösen Dosis 50 % (KID_{50}) bezogen auf das Testvolumen lautet wie folgt:

$$\log(KID_{50}) = -L - d(s - 0,5)$$

L – Logarithmus der niedrigsten Verdünnung
d – Differenz zwischen den log-Verdünnungsstufen
s – Summe der positiven Probanden umgerechnet auf die Mehrfachbestimmungen

4.2.2.4 Inaktivierung von Viren

Um Viren, welche in die Gefährdungsklassen der L2- oder L3-Organismen eingeordnet werden, unter S1-Laborbedingungen handhaben zu können, ist es nötig, diese zu inaktivieren. Aus Tabelle 10 kann die Kategorisierung der Viren anhand ihrer Sicherheitsstufe und die gewählte Inaktivierungsmethode entnommen werden.

4.2.2.4.1 Virusinaktivierung mit β -Propiolakton

Der Zellkulturüberstand virusinfizierter Zellen wurde abgenommen und 20 min bei 2000 x g abzentrifugiert um eventuell im ZKÜ vorhandene Zelltrümmer zu entfernen.

Der Überstand wurde in ein 50 ml Ehrlenmeyer-Kolben überführt und der pH auf 8,6 – 8,8 mit 0,1 M Natriumcarbonat-Puffer eingestellt, die Überprüfung erfolgte mit einem pH-Indikatorstreifen. Pro 5 ml ZKÜ wurden 5 μ l β -Propiolakton (BPL)-Lösung zu dem ZKÜ gegeben und für eine Stunde bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

Die anschließende vierstündige Inkubation im Brutschrank bei 37 °C erfolgte bei leichtem Rühren und einer regelmäßigen Überprüfung des pH-Wertes. Gegebenfalls wird dieser mit dem 0,1 M Na_2CO_3 -Puffer auf einen Bereich zwischen 8,6 und 8,8 eingestellt. Der ZKÜ wurde über Nacht im Kühlschrank belassen, dabei hydrolysiert das Lakton zur β -Hydroxy-Propionsäure. Nach einem abschließenden Einstellen des pH-Wertes auf 8,6 bis 8,8 wurde die Virussuspension bei 2000 x g für 15 min zentrifugiert, der pelletierte Niederschlag verworfen und der Überstand in 1 ml Aliquots bei -80 °C eingefroren. Die inaktivierten Virusproben wurden immer auf Zellkultur auf ihre Sterilität überprüft.

4.2.2.4.2 Virusinaktivierung mit β -Ethylenimin

Der ZKÜ virusinfizierter Zellen wurde nach der Ernte abzentrifugiert und durch einen 0,2 μ m Filter filtriert, um vorhandene Zelltrümmer zu entfernen. Die frisch angesetzte 0,2 M Betaethylenimin (BEI)-Lösung wurde eine Stunde bei 37 °C im Eppendorf-Schüttler inkubiert. Der pH-Wert der Lösung sollte bei 8,5 liegen. Pro 5 ml Virussuspension wurden 250 μ l bzw. 500 μ l der BEI-Lösung zum ZKÜ gegeben, was einer Endkonzentration von 10 mM bzw. 20 mM entsprach. Die Viren wurden sowohl mit 10 mM als auch 20 mM BEI inaktiviert, um für jede Viruscharge auszutesten, welche Konzentration eine Inaktivierung bei bestmöglicher Virusintegrität gewährleistet. Nach fünf Stunden Inkubation bei 37 °C im Überkopfschüttler erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit 25 μ l 1 M Natrium-Thiosulfat-Lösung pro 5 ml ZKÜ. Das inaktivierte Virusmaterial wurde über eine PD10-Gelchromatographie-Säule mit PBS umgepuffert und auf Zellkultur hinsichtlich der Effektivität der Inaktivierung geprüft.

4.2.2.4.3 Überprüfung der Virusinaktivierung

In einer 6-Well-Platte wurden je 4×10^5 der für das entsprechende Virus suszeptiblen Zellen kultiviert bis sich ein konfluenter Zellrasen gebildet hatte. Das Medium wurde abgenommen und als Negativkontrolle in ein Well 2 ml Medium und in eines als Positiv-Kontrolle 2 ml Medium mit 10 μ l aktivem Virus gegeben. In die restlichen drei Wells wurden je 500 μ l der inaktivierten Virusprobe pipettiert. Nach einer Inkubation im Brutschrank für 30 min wurde jedes Well mit 2 ml Medium aufgefüllt und über Nacht bei 37°C belassen. Am Folgetag wurde das gesamte Medium abgesaugt und der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch die Zugabe von je 3 ml 2,5 %igem Formalin. Nach zwei Stunden im Kühlschrank wurde das Formalin abgesaugt und der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen.

Der Virusnachweis erfolgte mit je 2 ml eines virusspezifischen in PBS-FT verdünnten Nachweis-Antikörpers, welcher für zwei Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur auf den fixierten Zellen inkubiert wurde. Nach drei Waschschritten mit PBS-T erfolgte die Konjugation des Antikörpers mit je 2 ml rabbit anti-mouse Peroxidase ($^PRA_{mo}$; 1:4000 in PBS-FT) bei Raumtemperatur für eine halbe Stunde und leichtem Schütteln. Das präzipitierende Substrat TMB wurde nach drei PBS-T-Waschschritten auf den Zellrasen gegeben (je 1 ml). Nach einer 10-minütigen Inkubation konnte die Blaufärbung der Zellen unter dem Mikroskop beurteilt werden. Dabei zeigte sich das Cytoplasma der Positivkontrolle in einer Blaufärbung, die Negativkontrolle und die Kontrollen der Inaktivierung sollten dagegen keine Blaufärbung aufweisen. Zeigten die mit den inaktivierten Viren inkubierten Zellen dennoch eine positive Farbreaktion, musste die Inaktivierung der Viruscharge wiederholt werden.

4.2.3 Immunologische Methoden

4.2.3.1 Aufreinigung von in Hybridoma-Zellkultur produzierten Antikörpern über eine GAM-Säule

Die Aufreinigung von Antikörpern aus einer Hybridomazellkultur erfolgte mittels Affinitätschromatographie über eine Goat-anti-Mouse Säule mit gegen Maus-IgG gerichteten Antikörpern der Ziege (GAM-Säule).

Nachdem die Säule ca. 20 min mit 0,1 M Carbonat-Bindungspuffer gespült und äquilibriert wurde, liefen 50 ml des 1:2 mit Puffer verdünnten ZKÜs in die Säule ein. Mit Hilfe eines in den Säulenkreislauf eingebauten Durchfluss-UV-Monitors konnte die steigende Proteinkonzentration verfolgt werden. Im Anschluss erfolgte ein 20-minütiger Spülschritt der Säule mit 0,1 M Carbonat-Bindungspuffer. Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgte mittels einer durch das Einlaufen von 0,1 M Glycinpuffer (pH 2,3) in die Säule hervorgerufenen pH-Änderung. Der dabei im Monitor gemessene Elutionspeak (5 ml) wurde aufgefangen und sofort über zwei PD10-Säulen gelchromatographisch umgepuffert. Das Eluat wurde in einem Centriprep mittels Ultrafiltration auf ein Volumen von ca. 1 ml eingeeengt (5 min, 2000 x g). Die GAM-Säule wurde mit 0,1 M Carbonatpuffer gespült und zum Abschluss mit 0,02 M Phosphatpuffer, welcher 0,05 % NaN₃ enthielt, gereinigt und konserviert.

4.2.3.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes von eluierten oder rekonstituierten Antikörpern erfolgte mittels Macro-Methode des Protein Assays der Firma Bio-Rad anhand des mitgelieferten Protokolls. Über die Fläche des Elutionspeaks beim Wechsel auf 0,1 M Glycinpuffer konnte die Antikörpermenge im Eluat abgeschätzt werden. Antikörper, welche sich nur in geringer Menge im Eluat befanden, mussten für eine Proteinbestimmung auf ein geeigneteres Volumen eingeeengt werden. Die Proteinbestimmung erfolgte dann mit dem Spektrophotometer NanoDrop der Firma NanoDrop Technologies, da hierfür unverdünnte Probenvolumina von 2 µl ausreichend waren.

4.2.3.3 Biotinylierung und Fluoreszenz-Labeling der Antikörper

Für die Biotinylierung von Antikörpern wurde das NHS-Biotin in einer Konzentration von 10 mg/ml in A. dest gelöst. Die Menge der zugegebenen Biotin-Lösung wurde wie durch den Hersteller vorgegeben auf 1/10 der IgG-Menge des zu labelnden Antikörpers eingestellt und mit diesem bei Raumtemperatur bei sanftem Schütteln zwei Stunden inkubiert. Zum Abstoppen der Kopplungsreaktion wurde die Antikörper-Lösung zu 10 mg Glycin gegeben und anschließend

über eine PD10-Säule umgepuffert. Der biotinylierte Antikörper wurde auf ca. 1 ml eingeeengt, zur Konservierung mit 0,01 % Thimerosal versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Für die Fluoreszenz-Markierung von NW-Aks wurde das Fluoreszenz-Molekül DyLight 649 der Firma Pierce gewählt. Es hat ein Absorptionsmaximum bei 646 nm und ein Emissionsmaximum bei 674 nm und hat somit ein vergleichbares Absorptions- und Emissionsspektrum wie Cy5. Für die Kopplung von Antikörpern mit DyLight 649 wurden 500 µl einer 1 mg/ml Antikörper-Lösung mit 50 µl einer 1 M NaHCO₃-Lösung versetzt. Der DyLight 649-NHS-Ester wurde in 100 µl DMSO gelöst und entsprechend der gewünschten Kopplungsverhältnisse (MR – *molecular ratio*) zum Antikörper-NaHCO₃-Ansatz gegeben. Die benötigte Menge der 10 mg/ml DyLight 649-Stocklösung für die getesteten Kopplungsverhältnisse kann aus Tabelle 11 entnommen werden. Nach einer einstündigen lichtgeschützten Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler wurde die Kopplungsreaktion mit 10 µl 10 % NaN₃-Lösung abgestoppt. Der gelabelte Antikörper wurde sofort zur Entfernung nicht abreagierter Farbstoffe über eine PD10-Säule umgepuffert. Im Anschluss erfolgte mit dem NanoDrop (Programm „Proteins and Labels“) unter Zuhilfenahme des molaren Extinktionskoeffizienten für DyLight 649 ($2,5 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) neben der Konzentrationsbestimmung die Messung des realen Kopplungsverhältnisses zwischen Fluoreszenz-Farbstoff und Antikörper.

Tabelle 11: Zu pipettierendes Volumen aus dem DyLight 649-Stock für theoretische Kopplungsverhältnisse zwischen Farbstoff und Antikörper

MR für die absolute Ak-Menge von 500 µg	Menge aus dem DyLight 649-Stock
MR 7,5	2,5 µl
MR 15	5 µl
MR 22,5	7,5 µl

4.2.3.4 ELISA

Ein ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) ist ein immunologisches Nachweisverfahren, welches ein Signal colorimetrisch über eine enzymatische Farbreaktion erzeugt. Der Virusnachweis wurde in Form eines Sandwich-ELISA durchgeführt. Dieser Mehrschichten-Aufbau bedeutet, dass das Virus an einen Fänger-Antikörper bindet und durch einen weiteren spezifischen Nachweis-Antikörper nachgewiesen wird. Zwischen den Kopplungsschritten erfolgen Waschschriffe, am Ende die enzymatische Nachweis-Reaktion.

Zunächst wurde der Fänger-Antikörper in einer Konzentration von 3 µg/ml an die Mikrotiterplatten-Oberfläche gekoppelt. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer im Kühlschrank über Nacht. Am nächsten Tag wurden nach drei Waschschriffen mit PBS-T die unspezifischen Bindungen in der Mikrotiterplatte zur Reduktion des Hintergrundes mit PBS-F für eine Stunde abgeblockt. Nach drei Waschschriffen konnten die Mikrotiterplatten getrocknet und versiegelt im Kühlschrank bis zum weiteren Gebrauch gelagert werden.

Für den Virusnachweis wurde in jedes Well der Mikrotiterplatte das nachzuweisende Antigen in der gewünschten Verdünnung gegeben. Die beiden letzten Spalten wurden für die Negativkontrolle genutzt, für die jeweils 100 µl PBS- dienten. Nach der Antigeninkubation wurden nach drei Waschschriffen 100 µl des mit PBS-FT verdünnten biotinylierten Nachweis-Antikörpers in jedes Well gegeben und ebenfalls in einer feuchten Kammer auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine halbstündige Inkubation mit 100 µl Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin (PSA), welches 1:4000 in PBS-FT eingesetzt wurde. Durch die Zugabe der TMB-Substratlösung nach dem Waschen erfolgte die Farbentwicklung der Reaktion. Nach 10 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von 50 µl einer 2 M H₂SO₄ abgestoppt, dabei erfolgte durch den niedrigen pH-Wert bei positiver Reaktion ein Farbumschlag von türkis zu gelb. Die Messung mit dem Photometer bei 450 nm erfolgte sofort im Anschluss.

In Tabelle 12 sind für die standardmäßig durchgeführten ELISA-Nachweise die Fänger- und Nachweis-Antikörper (inkl. Verdünnungen) sowie die Inkubationszeiten angegeben, welche für jede Antigen-Antikörper-Kombination unterschiedlich sein kann.

Das Austesten von Antikörpern neu in Kultur genomener Hybridomazellen erfolgte als ELISA auf virusinfizierten Zellen. Die im Hybridom-ZKÜ enthaltenen Antikörper wurden dabei nach ihrer Bindung an die infizierten Zellen mit einem 1:10000 in PBS-FT verdünnten Peroxidase-markierten anti-Maus-Antikörper von Kaninchen (^PRA_{mo}) und anschließender Entwicklung mit TMB nachgewiesen.

Tabelle 12: Zusammenfassung der durchgeführten Sandwich-ELISA-Nachweise

	Orthopocken	Ricin	EEEV	VEEV	WEEV
Kopplung Fänger-Antikörper	3 µg/ml O100/O101	3 µg/ml R1	3 µg/ml mAk-Mix (V100, V101, V102)	(1) 3 µg/ml V100 (2) 3 µg/ml mAk-Mix (V100, V101, V102)	3 µg/ml V102
Inkubation	4 °C über Nacht; feuchte Kammer	4 °C über Nacht; feuchte Kammer	4 °C über Nacht; feuchte Kammer	4 °C über Nacht; feuchte Kammer	4 °C über Nacht; feuchte Kammer
Blockieren	PBS-F	PBS-F	PBS-F	PBS-F	PBS-F
Inkubation	1 h 37 °C feuchte Kammer	1 h 37 °C feuchte Kammer	1 h 37 °C feuchte Kammer	1 h 37 °C feuchte Kammer	1 h 37 °C feuchte Kammer
Proben-Verdünnung	In PBS-FT	in PBS-FT	in PBS-FT	in PBS-FT	in PBS-FT
Inkubation	2 h 37 °C feuchte Kammer	30 min Rt. feuchte Kammer; Schüttler	3 h Rt. Feuchte Kammer; Schüttler	3 h Rt. feuchte Kammer; Schüttler	3 h Rt. feuchte Kammer; Schüttler
biotinylierter Nachweis-Antikörper	b O101	b R2	b V102	(1) und (2) b V109	b V102
Inkubation	1 h 37 °C feuchte Kammer	30 min Rt. feuchte Kammer; Schüttler	2 h Rt. Feuchte Kammer; Schüttler	2 h Rt., feuchte Kammer: Schüttler	2 h Rt. feuchte Kammer; Schüttler
Konjugat	PSA 1:4000	PSA 1:4000	PSA 1:4000	PSA 1:4000	PSA 1:4000
Inkubation	30 min Rt. feuchte Kammer; Schüttler	30 min Rt. feuchte Kammer; Schüttler	30 min Rt. Feuchte Kammer; Schüttler	30 min Rt. feuchte Kammer; Schüttler	30 min Rt. feuchte Kammer; Schüttler
Substrat	TMB	TMB	TMB	TMB	TMB
Inkubation	10 min Rt., Schüttler	10 min Rt., Schüttler	10 min Rt., Schüttler	10 min Rt., Schüttler	10 min Rt., Schüttler
Abstoppen	2 M H ₂ SO ₄	2 M H ₂ SO ₄	2 M H ₂ SO ₄	2 M H ₂ SO ₄	2 M H ₂ SO ₄

4.2.3.5 Immunologischer Virusnachweis im AP[®]-System

4.2.3.5.1 Prinzip der immunologischen Detektion von Viren im AP[®]-System

Das Prinzip des immunologischen Antigen-Nachweises im AP[®]-System entspricht dem eines Sandwich-ELISA. Der große Unterschied zwischen den beiden Systemen besteht darin, dass im AP[®]-System im Gegensatz zum Mikrotiterplatten-ELISA keine aufeinander folgenden Inkubationsschritte mit Waschschritten stattfinden, sondern die Inkubation aller Reagenzien der Reaktion gleichzeitig in einer abgeschlossenen Kammer als „Ein-Topf-Reaktion“ abläuft.

Auf der epoxyaktivierten Oberfläche der Biochips wurden verschiedene für Viren, Toxine und Bakterien spezifische Fänger-Antikörper immobilisiert. Diese können die Antigene spezifisch binden und erlauben über die Reaktion mit Nachweis-Antikörpern eine Detektion verschiedener Analyten.

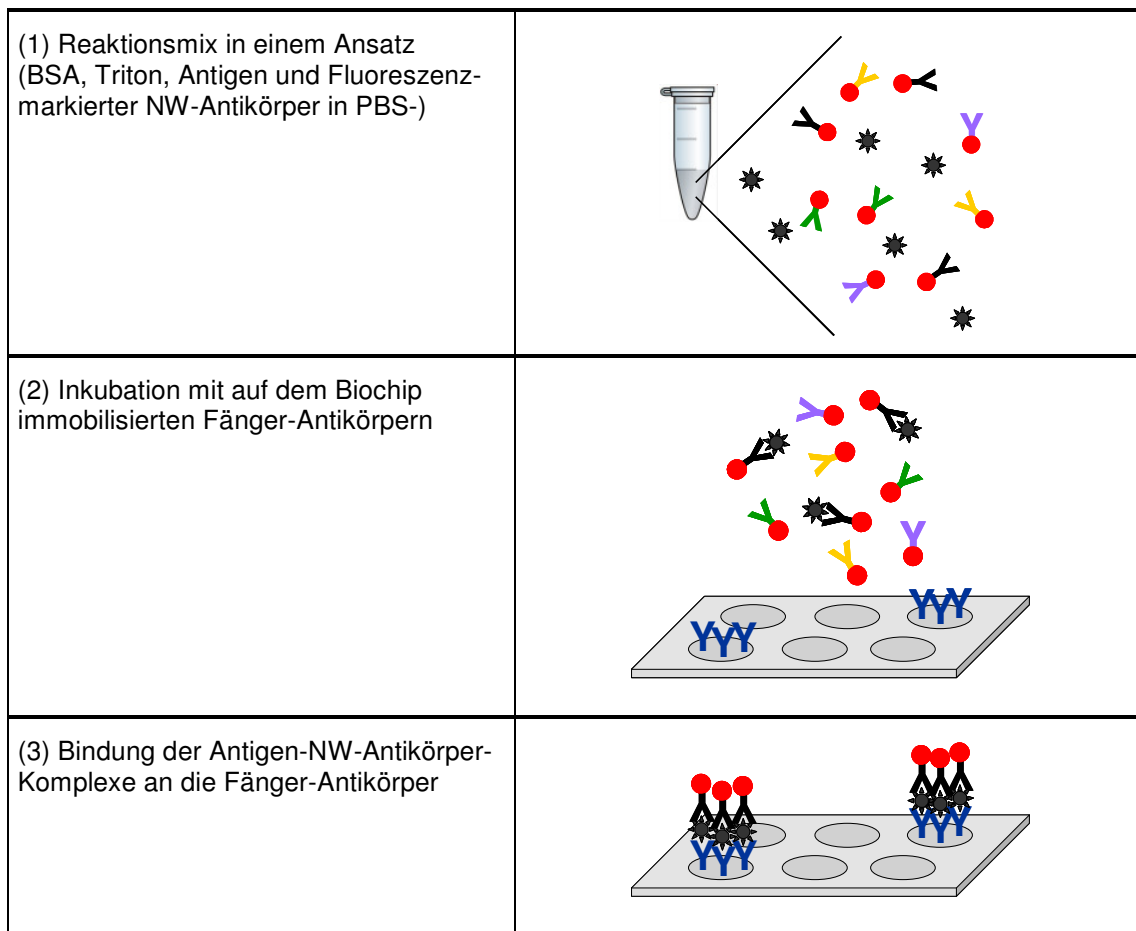


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines immunologischen Antigen-Nachweises im AP[®]-System

Der immunologische Nachweis von Viren, Bakterien und Toxinen erfolgte im AP[®]-Gerät in einem „Ein-Topf-Verfahren“. Der spezifische Fluoreszenz-markierte Nachweis-Antikörper wurde zusammen mit dem nachzuweisenden Antigen direkt in die Kartusche gegeben – Waschschriffe waren nicht nötig. Nach der erfolgten Reaktion zwischen Fänger-Antikörper, Antigen und Nachweis-Antikörper konnte das Fluoreszenzsignal direkt ausgelesen werden.

In einem standardisierten Detektionsansatz für das AP[®]-System befanden sich das Antigen (Virus, Bakterium oder Toxin), der spezifische Nachweis-Antikörper, welcher entweder direkt Fluoreszenz-markiert oder biotinyliert vorliegt, BSA und Triton in einer Lösung. Wurde ein biotinylierter Nachweis-Antikörper genutzt, wurde des Weiteren Streptavidin (SA)-DyLight 647 in den Ansatz gegeben, um eine Detektion über die Optik des AP[®]-Gerätes zu gewährleisten. Das BSA im Reaktionsansatz sättigte die unspezifischen Bindungen auf dem Biochip ab, die dadurch erfolgte Reduktion der Hintergrundsignale wurde durch die Zugabe von Triton noch gesteigert. Innerhalb der 30-minütigen Inkubation des Reaktionsmixes in der Kartusche bei 37°C erfolgte die Bindung des Antigens an seinen spezifischen Fänger-Antikörper und die Erkennung mit dem spezifischen Nachweis-Antikörper. Über eine optische Ausleseeinheit wurde das Fluoreszenzsignal der gebundenen NW-Aks detektiert (Abbildung 6).

4.2.3.5.2 Versuchsdurchführung

Alle in den Reaktionsansätzen eingesetzten Bakterien und Viren waren inaktiviert und konnten somit unter S1-Laborbedingungen gehandhabt werden.

Der Reaktionsansatz für einen immunologischen Virusnachweis im AP[®]-System beinhaltete, wenn nicht anders angegeben, folgende Bestandteile:

- PBS-
- BSA (0,5 % Endkonzentration)
- Triton X-100 (0,25 % Endkonzentration)
- Antigen (Bakterium, Toxin und/oder Virus)
- Nachweis-Antikörper
 - biotinyliert plus Zusatz von SA-DyLight 647 oder
 - Fluoreszenz-markiert (DyLight 649)

Für den Reaktionsansatz einer Kartusche wurde ein Gesamtvolumen von 100 µl angesetzt, von dem 50 µl in den Reaktionsraum der AP[®]-Kartusche injiziert wurden.

Um die Reproduzierbarkeit von Daten zu erfassen bzw. die intra- und interassay-spezifische Varianz von verschiedenen Biochips in zwei verschiedenen Kartuschen zu bestimmen, wurden Ansätze von 120 µl erstellt und je 50 µl pro AP[®]-Kartusche eingesetzt.

Soweit keine anderen Parameter in dieser Arbeit angegeben sind, wurden die Kartuschen mit folgenden Kriterien prozessiert:

- Prozessierungstemperatur: 37°C
- Prozessierungsdauer: 30 Minuten
- Bildaufnahmedauer: 10 Sekunden

4.2.4 Molekularbiologische Methoden

4.2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lässt sich DNA *in vitro* vermehren. Das dazu verwendete Enzym ist eine DNA-abhängige DNA-Polymerase, welche mit flankierenden Primern einen spezifischen Genabschnitt verdoppelt. Durch die Zyklisierung dieses Verfahrens kommt es zu einer exponentiellen Vervielfachung des gewünschten DNA-Abschnittes [201]. Der PCR-Prozess besteht aus der zyklischen Abfolge dreier Schritte: Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation. Abhängig von der Menge des eingesetzten Templates erfolgt die Amplifizierung über 15 bis 50 Zyklen.

Meist werden für die PCR Enzyme mit einer erhöhten Thermostabilität benutzt. Die dabei am meisten verwendete DNA-Polymerase wurde aus dem Mikroorganismus *Thermus aquaticus* isoliert und trägt daher den Namen Taq-Polymerase. Sie wurde erstmals 1969 von Thomas Brock und Hudson Freeze isoliert und beschrieben [202]. Einige der Taq-Polymerasen müssen vor der zyklischen Amplifikation über einen Hitzeschritt aktiviert werden und werden daher Hot Start Taq-Polymerasen genannt.

4.2.4.2 Reverse Transkription PCR

Um die Transkription eines Gens in Zellen, Geweben oder Blutproben zu untersuchen oder Viren nachzuweisen, welche ein RNA-Genom besitzen, ist es nötig, die sie beinhaltende RNA zu detektieren. Bei der Nutzung der Reversen Transkription-PCR (RT-PCR) werden zwei molekularbiologische Methoden kombiniert: die Reverse Transkription (RT) und die PCR. Bei der RT wird eine RNA-abhängige DNA-Polymerase genutzt, welche RNA in ss cDNA umschreibt. Die so gebildete cDNA dient nun als Template für die anschließend mit spezifischen Primern durchgeführte PCR.

Bei der hier durchgeführten RT-PCR wurden bei der RT neben dem für die Synthese der cDNA nötige reverse Primer auch der spezifische forward Primer in den Reaktionsansatz gegeben. Somit konnte gezielt einen bestimmten Genabschnitt der RNA-Viren in der RT isoliert und in der anschließenden PCR-Reaktion im gleichen Gefäß amplifiziert werden. Nach der Reversen Transkription wurde die DNA-Polymerase *Taq* über einen Hitzeschritt aktiviert und die Enzyme der Reversen Transkription deaktiviert (OneStep RT-PCR).

4.2.4.3 real-time (RT)-PCR

Eine Methode zur Quantifizierung der in der PCR gebildeten DNA-Menge stellt die real-time PCR (rt PCR) dar. Die Korrelation erfolgt über einen titrierten Genomäquivalent-Standard, von dem die Anzahl an Genomkopien bekannt ist. Sie kann sowohl für den Nachweis von DNA- als auch für RNA-Organismen mit einer vorgeschalteten RT genutzt werden. Die Quantifizierung erfolgt durch die Messung der Fluoreszenz während der PCR-Zyklen, welche proportional zur Menge der PCR-Produkte zunimmt. Dies erlaubt eine Verfolgung der DNA-Vervielfältigung in Echtzeit (*real-time –rt(RT)-PCR*).

Zur Quantifizierung von Mikroorganismen wurden in der vorliegenden Arbeit TaqMan-Sonden genutzt. Die TaqMan-Sonden sind an ihrem 5'-Ende mit dem 6-Carboxy-Fluorochrom 6-FAM-Phosphoramidit (FAM) gekoppelt (Donor), welches, wenn es mit einer Lichtquelle angeregt wird, einen Teil seiner Energie strahlungsfrei an einen in der Nähe befindlichen Quencher (Akzeptor) weitergibt. Der Quencher TAMRA ist an das 3'-Ende der Sonde gekoppelt und unterdrückt dadurch die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes FAM. Die TaqMan-Sonden binden im Laufe der PCR an den Einzelstrang des entstandenen aufgeschmolzenen PCR-Amplikons. Die DNA-Polymerase kann aufgrund ihrer Exonuklease-Aktivität die gebundene Sonde während des Elongationsschrittes der PCR abbauen. Dabei wird der Reporter-Farbstoff FAM zuerst freigesetzt und somit nicht mehr durch den Quencher in seiner Fluoreszenz unterdrückt und ein Anstieg der FAM-Fluoreszenz wird messbar. Zur Quantifikation der PCR wird der Ct-Wert (*cycle threshold*) genutzt, welcher angibt in welchem Zyklus, das Fluoreszenzsignal des Reporter-Farbstoffes der hydrolysierten TaqMan-Sonde das erste Mal signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz steigt.

4.2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA kann aufgrund ihres Phosphat-Rückgrates im elektrischen Feld elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Auftrennung von PCR-Fragmenten erfolgte in Abhängigkeit von der Amplikongröße in 1,8 %igen Agarosegelen für ungefähr eine Stunde in 1 x TBE-Puffer bei 100 V. Zur Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht wurde dem Gel vor der Polymerisation 1 µl einer 1mg/ml Ethidium-Bromid-Lösung (EthBr) pro 100 ml Gel zugegeben. EthBr interkaliert mit doppelsträngiger DNA und ermöglicht somit die Visualisierung durch die Bestrahlung des Gels mit UV-Licht im Transilluminator. Anhand eines mitgelaufenen Markers (10 µl einer 100 bp DNA Ladder) ließ sich die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente abschätzen.

4.2.4.5 Molekularbiologischer Virusnachweis mittels AP[®]-System

4.2.4.5.1 Prinzip der molekularbiologischen Detektion von DNA- und RNA-Viren im AP-System

Auf dem Biochip eines Nukleinsäure-APs[®] sind anders als beim Protein Array keine Antikörper immobilisiert, sondern DNA-Sonden. Die für diese Arbeit verwendeten Sonden sind DNA-Einzelstrang-Moleküle mit einer Länge von 20 bis 35 Nukleotiden (nt), welche spezifische Genabschnitte von Viren darstellen, mit denen diese identifiziert werden können.

Nach der Extraktion des Virusgenoms wurde in der Kartusche ein spezifischer Genabschnitt mittels PCR amplifiziert. Um die dafür notwendige doppelsträngige DNA zu erhalten, musste bei RNA-Organismen wie den Alpha- oder Flaviviren der PCR eine Reverse Transkription vorangestellt werden (siehe 4.2.4.2 und Abbildung 7 mittlere Spalte). Dabei wurde aus dem einzelsträngigen RNA-Genom das Template für die anschließende PCR (ss cDNA) generiert. Die Amplifikation des gewünschten Genabschnittes erfolgte mit einem Cy5 gelabelten reversen Primer, was dazu führte, dass ein Strang des erzeugten Amplikons Fluoreszenzmarkiert war. Nach dem Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges in einem Denaturierungsschritt erfolgt die Hybridisierung des gelabelten Einzelstranges an die auf dem Chip immobilisierten Hybridisierungssonden (Abbildung 7 Schritt 5).

Der Nachweis von DNA-Viren, wie z.B. die Orthopockenviren erfolgte nach demselben Prinzip, um die gleichzeitige Identifikation des DNA-Virus mit den RNA-Viren zu ermöglichen, jedoch ohne vorgeschaltete RT. Dabei fungierte das Vaccinia-Virus als Modellvirus für den Erreger der echten Pocken Variola Major und der weißen Pocken Variola minor. Nach der Isolation des ds DNA-Genoms wurde dieses als Template mit dem spezifischen forward und Cy5-gelabelten reverse Primer in den Reaktionsmix gegeben und in der Kartusche mit dem RT-PCR-Protokoll der RNA-Viren prozessiert. Die RT verlief dabei im „Leerlauf“, da sich kein RNA-Template zum Umschreiben in ss cDNA im Reaktionsansatz befand. Anschließend wurde der spezifische Genabschnitt des DNA-Genoms mit Hilfe der PCR in der AP[®]-Kartusche amplifiziert und konnte nachgewiesen werden (Abbildung 7 rechte Spalte). Die standardmäßige Anwendung des RT-PCR-Kits und dem damit verbundenen Protokoll stellt eine Möglichkeit dar, die Nachweise von DNA- und RNA-Viren zu kombinieren.




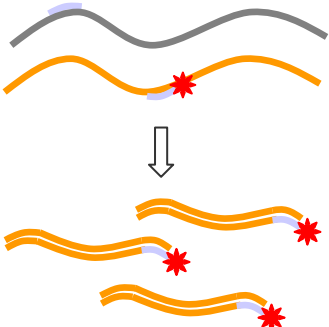
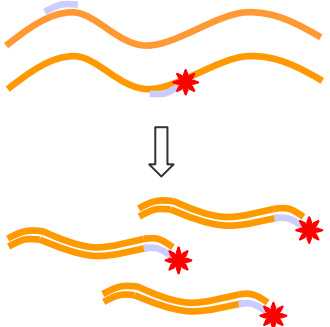
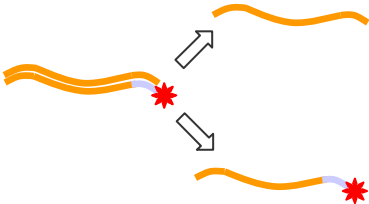
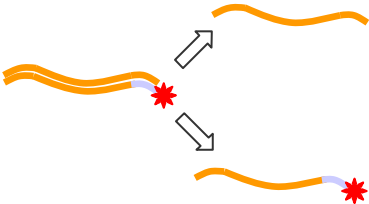
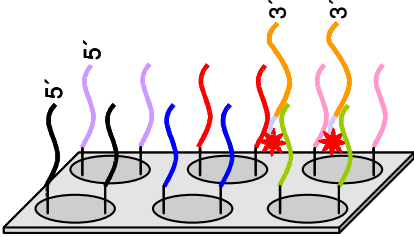
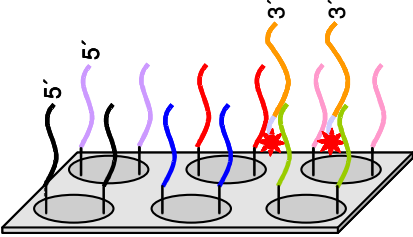



	RNA-Viren	DNA-Viren
(1) Isolierung des Virusgenoms	 ssRNA	 dsDNA
(2) Reverse Transkription	 ss cDNA	Nicht notwendig
(3) PCR mit virusspezifischen Primern		
(4) Denaturierung des PCR-Amplikons		
(5) Hybridisierung des Cy5-gelabelten Stranges mit spezifischen Fängersonden		
  	Cy5-Label Primer C7-Linker der immobilisierten Sonden	

Abbildung 7: Schematische Beschreibung des AP[®]-Detektionsprinzips für ein Nukleinsäure-Array

3'-modifizierte Oligonukleotide wurden als Fängersonden genutzt. Nach der Isolierung des Virusgenoms liefen die Schritte 2 bis 5 ohne Unterbrechung innerhalb der Kartusche ab. Während für die spezifische Amplifikation von RNA-Virussequenzen die Reverse Transkription von RNA in cDNA vor der PCR nötig war, diente das Genom von DNA-Viren direkt als Template für die PCR. Anschließend wurde das virusspezifische Amplikon denaturiert und der Cy5-gelabelte Einzelstrang hybridisierte direkt mit den auf dem Biochip immobilisierten Sonden. Die Sonden banden das Template über ihre gesamte Länge an das Template – zur Vereinfachung wurde hier nur ein kleiner komplementärer Abschnitt dargestellt.

4.2.4.5.2 Sondenkonzipierung

Für die Konzipierung von Primern und Sonden für den molekularbiologischen Nachweis einer Virusspezies müssen die Genome sämtlicher für den Nachweis relevanter Virusstämme mit einbezogen werden. Im Folgenden soll am Beispiel von VEEV die Herangehensweise zur Planung spezifischer Primer und Sonden dargestellt werden.

In die Consensus-Sequenz und die forward und reverse Primer für VEEV im E1- bzw. E2-Gen flossen die im EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) bis April 2008 vorhandenen Nukleinsäure-Datenbanksequenzen diverser humanpathogener VEEV-Stämme der serologischen Gruppen IAB, IC und ID ein. Diese können Tabelle 13 entnommen werden.

Es wurde ein multiples Sequenzalignment der viralen Genome der in Tabelle 13 genannten VEEV-Stämme durchgeführt. Dies erfolgte mit dem Computerprogramm *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), welches die optimale Übereinstimmung der Nukleinsäuresequenzen der viralen Genome anhand von Sequenzähnlichkeiten und -abweichungen berechnet. Das entstandene multiple Sequenzalignment der acht betrachteten VEEV-Stämme wurde im Anschluss mit Hilfe des Consensus-Programms (<http://coot.embl.de/Alignment/consensus.html>) des EMBL in eine Consensus-Sequenz umgewandelt. Im Genom des VEEV-Stammes TC-83 erstreckt sich das E2-Gen über die Nukleotide 8564 bis 9832 und das E1-Gen über den Abschnitt 10001 bis 11326, somit ergab sich eine 1326 nt (E1-Gen) und 1269 nt (E2-Gen) lange Consensus-Sequenz, welche für die Konzipierung von Primern und stammspezifischen als auch von Consensus-Sonden herangezogen werden konnte.

Tabelle 13: Für die Primer- und Sondenkonzeption berücksichtigte VEEV-Stämme

Serologische Gruppe	VEEV-Stämme	Accession-Nummer
IAB	Trinidad Donkey (TrD)	L01442
	TC-83	L01443
IC	P676	AF375051
	243937	AF004459
	SH3	U55360
	V198	U55342
ID	3880	L00930
	8131	DQ390224

4.2.4.5.3 Versuchsdurchführung

Wenn nicht anders erwähnt, wurde für den Nachweis der RNA-Viren das OneStep RT-PCR Kit der Firma Qiagen und für die DNA-Viren das Phusion-Kit der Firma Finnzymes verwendet. Die Aufreinigung der Virusnukleinsäure erfolgte mit dem QIAamp DNA Mini Kit (DNA-Viren) bzw. dem QIAamp Viral RNA Mini Kit (RNA-Viren) der Firma Qiagen anhand des mitgelieferten Protokolls. Im Folgenden sind die Bestandteile eines 50 µl RT-PCR- bzw. PCR-Routineansatzes angegeben.

Tabelle 14: Zusammensetzung der RT-PCR- bzw. PCR-Ansätze

RNA-Viren	DNA-Viren
- 5x OneStep RT-PCR-Puffer (enthält 12,5 mM MgCl ₂)	- 5x Phusion HF-Puffer (enthält 7,5 mM MgCl ₂)
- 25 mM MgCl ₂ (abhängig von der NW-Reaktion in einer Endkonzentration von 4 bis 12 mM)	- 25 mM MgCl ₂ (in einer Endkonzentration von 8 mM)
- dNTPs (je 400 µM pro Nukleotid)	- dNTPs (je 400 µM pro Nukleotid)
- forward und reverse Primer	- forward und reverse Primer
- 2 µl RNA-Template	- 2 µl DNA-Template
- 1 µl OneStep RT-PCR Enzyme Mix	- 0,5 µl Phusion DNA-Polymerase
- RNase freies H ₂ O ad 50 µl	- RNase freies H ₂ O ad 50 µl

Als Prozessierungsprogramm für den molekularbiologischen Virusnachweis im AP[®]-System wurden die in Tabelle 15 und Tabelle 16 angegebenen Standard-Protokolle genutzt. Bei einer Prozessierung im Opticon-PCR-Gerät (Bio-Rad) entfielen die beiden letzten Schritte der Protokolle (Denaturierung des DNA-Doppelstranges und Hybridisierung). Im AP[®]-System erfolgte nach der Hybridisierung die Bildaufnahme mit einer Belichtungszeit von 10 s.

Tabelle 15: Standard-RT-PCR-Programm für den Nachweis von RNA-Viren

Programmschritt	Temperatur	Dauer
Aufschmelzen der RNA-Sekundärstruktur	62 °C	1 min 30 s
Reverse Transkription	50 °C	25 min
Aktivierungsschritt Taq-Polymerase	95 °C	15 min
Denaturierung	94 °C	5 s
Annealing	55 °C	15 s
Extension	60 °C	35 s
Final Extension	60 °C	2 min
Denaturierung des DNA-Doppelstranges	94 °C	2 min
Hybridisierung	50 °C	30 min

45 Zyklen

Tabelle 16: Standard-PCR-Programm für den Nachweis von DNA-Viren

Programmschritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	95 °C	30 s	
Denaturierung	95 °C	5 s	45 Zyklen
Annealing	60 °C	10 s	
Extension	72 °C	20 s	
Final Extension	72 °C	2 min	
Denaturierung des DNA-Doppelstranges	94 °C	2 min	
Hybridisierung	50 °C	30 min	

4.2.5 Elektronenoptische Methoden

4.2.5.1 Elektronenmikroskopie

Das Auflösungsvermögen von Lichtmikroskopen liegt bei etwa 200 nm, was einer ca. 1000-fachen Vergrößerung des zu untersuchenden Objektes entspricht. Bei einer höheren Vergrößerung kommt es aufgrund der verwendeten Wellenlänge des Lichtes und dem damit verbundenen begrenzten Auflösungsvermögen des Lichtmikroskops zu unscharfen Bildern, die es nicht erlauben die feinen Strukturen der Probe zu erkennen.

Bei einem Elektronenmikroskop wird als Strahlungsquelle eine Kathode benutzt, welche bei Erhitzung (ca. 2500 °C) Elektronen emittiert. Diese Thermoelektronen werden zu einem Elektronenstrahl gebündelt und fließen Richtung Anode, wenn man eine positive Spannung (Rasterelektronenmikroskop (REM): 1 bis 30 kV; Transmissionselektronenmikroskop (TEM): 80 kV) anlegt. Zwei Kondensorlinsen fokussieren den Strahl auf der zu untersuchenden Probe, wobei eine Blende in der Objektivlinse stark gestreute Elektronen ausblendet. Kommen die emittierten Elektronen mit der Probe in Kontakt, werden sie innerhalb dieser gestreut, verlieren schrittweise ihre Energie und werden durch die Probe absorbiert. Die Streuung der Elektronen ist von der Energie der Elektronen, der Elementzusammensetzung und der Dichte innerhalb der Probe abhängig. Zur Analyse einer Probe können bei der Elektronenmikroskopie entweder die von der Oberfläche reflektierten (REM) oder die durch die ultradünne Probe transmittierten Elektronen (TEM) erfasst werden. Im Weiteren soll nur noch auf das Funktionsprinzip des REM eingegangen werden.

Wenn der einfallende Elektronenstrahl in die Probe eindringt, werden sekundäre Elektronen durch die Emission der Valenzelektronen der Probenatome gebildet. Die auf der Oberfläche gebildeten sekundären Elektronen werden aus der Probe emittiert, d.h. ihre Verteilung ist von der Oberflächenstruktur abhängig. Die gestreuten und emittierten Elektronen werden durch Elektromagnete gebündelt und von einem Detektor erfasst. Abhängig von den

unterschiedlich energiereichen Elektronen, welche von einem Punkt registriert werden, wird die Topographie der abgerasterten Probenoberfläche zusammengesetzt. Die Wellenlänge des Elektronenstrahls ist wesentlich kleiner als die des sichtbaren Lichtes, daher ergibt sich für die Elektronenmikroskopie ein maximales Auflösungsvermögen von 0,2 nm (TEM) bzw. von ca. 3 nm (REM).

4.2.5.1.1 Probenpräparation

Für die Untersuchung der Bindung des zu detektierenden Antigens an die Antikörper-Spots auf den AP[®]-Immuno-chips wurden diese anhand der unter 4.2.3.5.2 beschriebenen Protokolle mit einer inaktivierten *E.coli*-Präparation inkubiert. Dafür wurde der Biochip aus der AP[®]-Kartusche ausgebaut und unter möglichst staubfreien Bedingungen in einer Petrischale gelagert. In den AP[®]-Reaktionsansatz wurde kein Nachweis-Antikörper gegeben, da für die Analyse der spezifischen Antigen-Bindung an die Fänger-Antikörper lediglich diese beiden Komponenten benötigt werden.

Nach der Inkubation wurden die Biochips dreimal mit PBS gewaschen und nach einem abschließenden Waschschrift mit A. dest getrocknet. Etwaige unter dem Lichtmikroskop sichtbare Verunreinigungen wurden vor der weiteren Präparation mit Druckluft entfernt.

4.2.5.1.2 Vorbereitung der Proben für die Elektronenmikroskopie

Aufladungseffekte nichtleitender Proben stellen ein großes Problem bei der Elektronenmikroskopie dar. Bei einer zu niedrigen Energie der Elektronen werden nur wenige Sekundärelektronen von der Probe emittiert und es kommt in dieser zu einer lokalen negativen Aufladung. Weist der Elektronenstrahl eine zu hohe Energie auf, resultiert dies in einer positiven Aufladung der abgerasterten Oberfläche. Diese Effekte kann man verhindern, indem man eine nichtleitende Probe vor ihrer Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop mit einer elektrisch leitenden Edelmetall- (Platin-Palladium, Gold o.ä.) oder Kohlenstoffschicht versieht (Sputtern). Dabei wird die Probe in einem Vakuum unter der Einleitung von Argon und dem Anlegen einer Hochspannung mit Atomen des Edelmetall-Targets beschichtet. Dabei kann die Sputterschichtdicke gemessen werden. Bei den REM-Untersuchungen wurden die Proben entweder mit einer Gold- (ca. 20 nm) oder einer Platin-Palladium-Schicht (2 nm) versehen. Bei der Goldbeschichtung ergab sich eine gröbere Körnung der Metallschicht aus 2 bis 10 nm großen Goldinseln auf der Probenoberfläche, wohingegen die Platin-Palladium-Beschichtung eine Körnung aus 0,5 nm großen Metallinseln erzeugte. Die geringere Schichtdicke und die kleinere Körnung erlauben bei der Palladiumbeschichtung im REM die Abbildung der echten Oberfläche der zu untersuchenden Probe, während die Goldbeschichtung die Oberflächenstruktur vollkommen zudeckt.

5 Ergebnisse

Zu Beginn der Arbeit stand für die immunologischen und molekularbiologischen Nachweise die Optimierung von Einzelparametern im Vordergrund. Zum Teil konnte dabei auf Voruntersuchungen des Biologischen Zentrallabors des WIS zurückgegriffen werden.

Für die immunologischen Virusnachweise in der AP[®]-Kartusche wurden aufgrund der Voruntersuchungen eine Prozessierungszeit von 30 Minuten und eine Temperatur von 37°C gewählt. Des Weiteren wurde bovines Serumalbumin (BSA) zur Blockierung unspezifischer Bindungen auf dem Biochip verwendet.

Die molekularbiologischen Virusnachweise wurden zunächst mit den für die real-time RT-PCR bzw. PCR optimierten Prozessierungsprotokollen durchgeführt (Tabelle 15 und Tabelle 16) und in den nachfolgenden Arbeiten zusammen mit dem Reaktionsmix an das AP[®]-System angepasst.

5.1 Immunologischer Antigen-Nachweis mit dem AP[®]-System

5.1.1 Optimierung des immunologischen Antigen-Nachweises

Zusätzlich zu den bereits etablierten Parametern wurden für die Optimierung der immunologischen BWA-Nachweise im AP[®]-System weitere Konstanten der Prozessierung ausgetestet und geprüft. Betrachtet wurden dabei der Einfluss des Waschens des Biochips vor dem Einbau in die Kartusche, die Pipettierbedingungen beim Ansetzen des Reaktionsmixes, die Signalentwicklung bei der Verlängerung der Prozessierungszeit, der Einfluss der Markierung der Nachweis-Antikörper und die Antigenstandardisierung. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Optimierung kurz zusammengefasst.

1. Waschen der Biochips nach dem Spotten: Es wurde untersucht, ob das Waschen der Biochips mit PBS nach dem Spotten und vor dem Einbau in die Kartusche Unspezifitäten bei gleich bleibenden spezifischen Signalen reduzieren kann. Dies stellt bisher die einzige Möglichkeit in der Kartusche dar, überschüssige, nicht kovalent gebundene Fänger-Antikörper von den Spots des Biochips zu entfernen. Ein Spülschritt vor der Injektion des Reaktionsmixes ist aufgrund der baulichen Gegebenheiten der Kartusche bisher nicht möglich.
Die Behandlung führte jedoch zu einem Verlaufen der Spots in die unblockierten Spotzwischenräume (Daten nicht gezeigt). Somit war eine genaue Abschätzung der Effizienz dieser Behandlung nicht möglich.
2. Pipettierbedingungen: Mit Beginn der Arbeit war aufgrund der Datenlage nicht eindeutig zu entscheiden, inwieweit sich verschiedene Pipettierbedingungen auf die Konstanz der Ergebnisse und die Höhe der Signalintensitäten auswirken. Daher wurde untersucht, ob

das Zusammenpipettieren des Reaktionsmix auf Eis oder bei Raumtemperatur einen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse oder auf die Signalthöhe hat.

Die Temperaturbedingungen bei Reaktionsansatz schlugen sich jedoch nicht wesentlich auf die Höhe der spezifischen und unspezifischen Signale nieder (Daten nicht gezeigt).

3. Prozessierungszeit und -temperatur: Es konnte in verschiedenen Experimenten für die Detektion von VEEV gezeigt werden, dass eine Prozessierung der AP[®]-Kartusche bei 37°C für 30 Minuten einen ausgewogenen Kompromiss zwischen der erforderlichen Schnelligkeit des Assays und der notwendigen Sensitivität darstellt.

Eine weitere signifikante Signalsteigerung konnte nur durch eine Verlängerung der Prozessierung um 30 oder gar 60 Minuten erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Die Erhöhung der Signale um ca. 50 % steht allerdings in keinem Verhältnis zur Verlängerung der Prozessierungsdauer.

4. Nachweis-Antikörper: Voruntersuchungen haben gezeigt, dass in der Regel biotinylierte Nachweis-Antikörper höhere spezifische Signale hervorriefen als direkt-markierte Antikörper. Dies galt insbesondere für den Nachweis von Orthopocken (Abbildung 8). Diese erhöhten Signale waren jedoch meist mit höheren Kreuzreaktionen und Unspezifitäten in den Negativkontrollen verbunden.

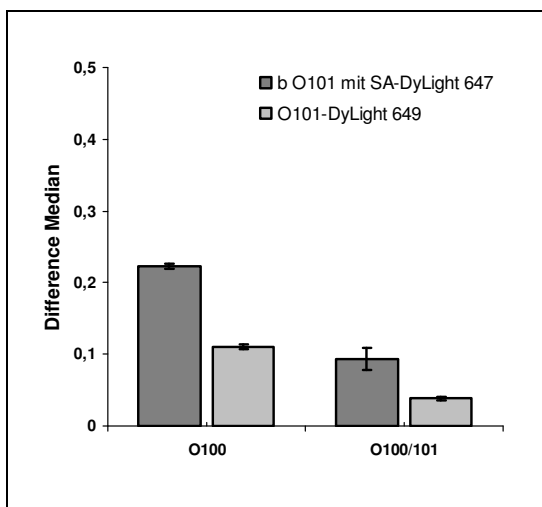


Abbildung 8: Einfluss der Antikörpermarkierung auf die Signalintensität

Dargestellt sind die spezifischen Signale (Erklärung zur Auswertung siehe 4.1.9.4) der Fänger-Antikörper O100 und O100/101 beim Nachweis von 1×10^5 KID₅₀/ml VacV. Der Nachweis erfolgte zum einen mit b O101 und SA-DyLight 647 und zum anderen mit einem DyLight 649-markiertem O101-Antikörper. Der VacV-Nachweis mit b O101 erzielte im Vergleich zum Nachweis mit dem direkt-markierten Antikörper höhere Signale.

Allgemein lässt sich ableiten, dass alle Nachweis-Antikörper – biotinyliert und/oder Fluoreszenz-markiert – vor ihrem Einsatz im AP[®]-System diesbezüglich ausgetestet werden müssen.

Ein höheres molares Kopplungsverhältnis von DyLight 649 und Detektionsantikörper hatte bei den beiden untersuchten Nachweisen (VEEV und VacV) keinen Effekt auf die spezifische Signalintensität, bei dem OPV-Nachweis-Antikörper erhöhten sich der Hintergrund und die Kreuzreaktionen dadurch beträchtlich (Abbildung 9).

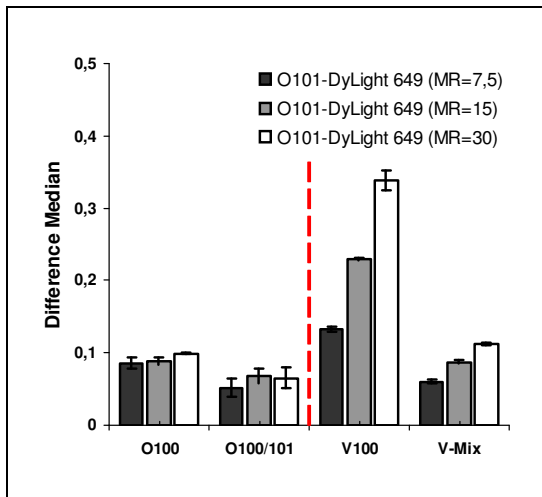


Abbildung 9: Einfluss des molaren Kopplungsverhältnisses auf die Signalintensität

Dargestellt sind sowohl die Signale der spezifischen Fänger-Antikörper O100 und O100/101 als auch der unspezifischen Fänger-Antikörper V100 und V-Mix beim Nachweis von 1×10^5 KID₅₀/ml VacV. Der Nachweis erfolgte mit O101, welcher in unterschiedlichen Kopplungsraten mit DyLight 649 gekoppelt wurde. Es konnten mit zunehmendem Kopplungsverhältnis keine erhöhten spezifischen Signale detektiert werden, die Kreuzreaktionen stiegen allerdings erheblich an.

5. Blockingreagenzien: Die bei der Vaccinia-Virus-Detektion ermittelten Kreuzreaktionen mit den VEEV-Fängern ließen sich durch eine Veränderung der BSA-Konzentration und der ergänzenden Zugabe von bis zu 1 % Milchpulver zwar enorm reduzieren, allerdings verringerte sich damit auch das spezifische Signal fast bis zur Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt). Eine stärkere Blockierung stellt somit für die Reduktion der Kreuzreaktionen kein probates Mittel dar.
6. Antigenstandardisierung: Anhand des Vergleichs verschiedener Präparationen des VEE-Virus konnte gezeigt werden, dass ein höherer Titer der Viruspräparation nicht zwangsläufig mit einer Steigerung der Signalintensität verbunden ist. Viruspräparationen enthalten immer eine unterschiedliche Menge an Tot-Antigen, das bei der Titerbestimmung nicht zum Tragen kommt, aber beim immunologischen Nachweis durchaus einen positiven Effekt auf die Signalstärke hat. Genauso ergaben unterschiedliche Ricin-Aufreinigungen (Rein- und Rohtoxin) bei gleich eingestellter Proteinkonzentration unterschiedliche und nicht immer miteinander vergleichbare Signale (Daten nicht gezeigt).

5.1.2 Untersuchung der Antigenbindung auf dem AP[®]-Biochip

Bei verschiedenen immunologischen Virusnachweisen in der AP[®]-Kartusche zeigte sich eine inhomogene Signalverteilung über die Spots, wobei eine erhöhte Signalintensität an den Rändern im Vergleich zum Zentrum des Spots erkennbar war. Daher sollte die spezifische Antigen-Bindung an die Fänger-Antikörper auf dem Biochip am Beispiel von *E.coli* mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie untersucht werden.

Die Biochips wurden wie unter 4.2.5.1.1 und 4.2.5.1.2 beschrieben präpariert und unter dem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Um eine Bindung möglichst vieler *E.coli*-Bakterien an den AP[®]-Biochip zu gewährleisten, wurde hier eine Keimzahl von 2×10^7 cfu/ml gewählt. In

Abbildung 10 und Abbildung 11 sind die Ergebnisse der Gegenüberstellung der REM-Aufnahmen und des AP[®]-Nachweises dargestellt. Die Bindung des bakteriellen Antigens erfolgte nicht homogen über den gesamten Spot, sondern verstärkt an den Rändern (Abbildung 10a und b). Dies spiegelte auch die Inhomogenität des Spots nach einem spezifischen immunologischen *E.coli*-Nachweis wieder (Abbildung 10c).

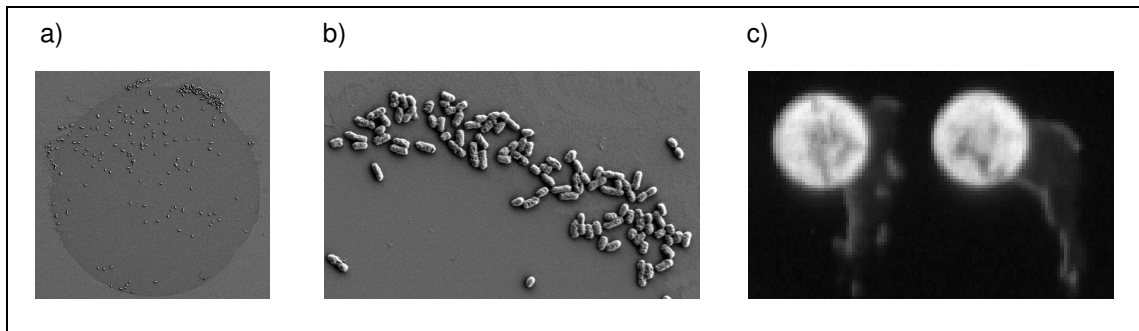


Abbildung 10: Vergleich der Homogenität der Antigenbindung mit dem REM und in der AP[®]-Analyse

Dargestellt ist die Bindung von *E.coli* an den *E.coli*-spezifischen Fänger-Antikörper E1 und das daraus resultierende Signalmuster nach einer AP-Analyse.

a) Übersichtsdarstellung des E1-Spots nach der Inkubation mit 2×10^7 cfu/ml *E.coli* (REM-Aufnahme: 500-fache Vergrößerung, SE2-Detektor); b) Vergrößerung des rechten oberen Bildausschnittes von a) (REM-Aufnahme: 3000-fache Vergrößerung, SE2-Detektor); c) Bildvergrößerung des immunologischen *E.coli*-Nachweises (2×10^5 cfu/ml) mit b E2 Ak und SA-DyLight 647.

Um einen so genannten Halo- oder Doughnut-Effekt mit erhöhten Signalintensitäten an den Rändern des Spots im Vergleich zum Zentrum zu verhindern, kann dem Spottingpuffer 1,5 M Betain bzw. 0,1 % BSA zur Förderung homogenerer Protein-Spots zugegeben werden [150,203].

Des Weiteren konnten im REM Unregelmäßigkeiten in der Spotform nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um gerichtete „Ausblutungen“ des Spots über dessen Rand hinaus (Abbildung 11a und b). Die „Ausblutungen“ könnten das Resultat des Biochip-Trocknungsprozesses unter Luftstrom sein, bei dem die Flüssigkeit des nicht vollständig getrockneten Antikörper-Spots in Richtung des Gasstromes weggetragen wird. Alternativ könnten die Ausblutungen eine Folge der Injektion des Reaktionsmixes (oder hier der Antigenlösung) sein.

Wie die Inhomogenität der Antigenbindung hat auch die asymmetrische Spotform einen Einfluss auf die Signalintensität des Antigen-Nachweises in der AP[®]-Kartusche (Abbildung 11c). Die „Ausblutungen“ werden zusammen mit dem regulären Spot als eine Einheit durch das AP[®]-Auswerteprogramm erkannt. Dies hat zur Folge, dass die Signalintensität, welche als Median

wiedergegeben wird, aufgrund der schwächeren Signale der „Ausblutungen“ und des sie umgebenden Hintergrundes einen geringeren Gesamtwert aufweist.

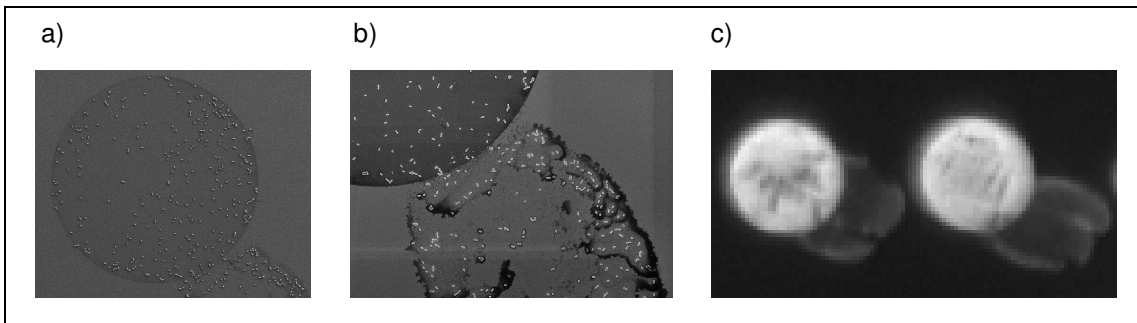


Abbildung 11: Vergleich des Effektes auslaufender Spots mit dem REM und in der AP[®]-Analyse

Dargestellt ist die Bindung von *E.coli* an den *E.coli*-spezifischen Fänger-Antikörper E1 und das daraus resultierende Signalmuster nach einer AP[®]-Analyse.

a) Übersichtsdarstellung des E1-Spots nach der Inkubation mit 2×10^7 cfu/ml *E.coli* (REM-Aufnahme: 500-fache Vergrößerung, SE2-Detektor); b) Vergrößerung des rechten unteren Bildausschnittes von a) (REM-Aufnahme: 800-fache Vergrößerung, InLens-Detektor); c) Bildvergrößerung des immunologischen *E.coli*-Nachweises (2×10^5 cfu/ml) mit b E2 Ak und SA-DyLight 647.

Bei weiteren elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der gebundenen Bakterien nicht der zu erwartenden Verdünnung entspricht. Bei der Inkubation des Biochips mit einer 1:10 verdünnten *E.coli*-Präparation wurden nicht 10-mal mehr Bakterien spezifisch gebunden als bei einer 1:100 Verdünnung – es scheint eine maximale Bindungskapazität der Antikörper-Spots zu geben, über die hinweg keine weiteren Partikel gebunden werden. Die Anzahl der gebundenen *E.coli*-Keime pro Spot entsprachen in der 1:100 Verdünnung der abgeschätzten Menge. Dafür wurde die Spotgröße in Relation zur Gesamtgröße des Biochips gesetzt und berechnet, wie viele Keime theoretisch an diesen Spot aufgrund ihrer Sedimentation binden können. Im Folgenden und in Tabelle 17 ist eine kurze Zusammenstellung der Berechnung dargestellt.

Bei einem Titer der *E.coli*-Präparation von 2×10^8 cfu/ml befanden sich in 100 µl einer 1:100 Verdünnung theoretisch 2×10^5 Keime. Von den auf den Biochip pipettierten 100 µl verblieb ungefähr ein Drittel auf dem Biochip, das restliche Volumen lief auf die darunter liegende Leiterplatte. Diese $6,7 \times 10^4$ cfu sedimentierten auf dem Biochip, welcher eine Gesamtfläche von 9 mm² (3 mm x 3 mm) aufweist. Ein spezifischer Antikörper-Spot hat ein Durchmesser von 120 µm, was einer Fläche von 0,011 mm² entspricht. Berechnet man nun die Anzahl der *E.coli*-Bakterien, welche aufgrund des Absetzens unter dem Einfluss der Schwerkraft an einen spezifischen E1-Spot binden könnten, ergibt sich eine Keimanzahl von rund 82 Bakterien.

Tabelle 17: Berechnung der theoretisch gebundenen Keime einer 1:100 verdünnten *E.coli*-Präparation an einen Biochip-Spot

Titer <i>E.coli</i> 1:100 Verdünnung	Keime auf dem Biochip (unter der Voraussetzung dass nur 1/3 der 100 µl auf dem Biochip verbleibt)	Fläche Biochip vs. Fläche eines Spots	theoretisch an einen Spot gebundene <i>E.coli</i> -Keime
2×10^6 cfu/ml → 2×10^5 cfu/100 µl	$6,7 \times 10^4$ cfu	Biochip-Fläche: 9 mm^2 Spotdurchmesser: 120 µm → Fläche: $0,011 \text{ mm}^2$ → Verhältnis Spotfläche zu Biochip-Fläche: 1:820	1 / 820 von $6,7 \times 10^4$ cfu → ca. 82 cfu

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von AP[®]-Biochips, welche mit 2×10^5 cfu/ml *E.coli* inkubiert wurde, konnte festgestellt werden, dass nur noch vereinzelt Bakterien (maximal 8 Keime) an den spezifischen Antikörper-Spots vorzufinden waren. Bei einer weiteren Verdünnung unter diese Keimzahl konnte unter dem REM kein Antigen auf den Spots detektiert werden – dies entspricht auch der theoretischen Erwartung.

Bei der immunologischen Detektion im AP[®]-System konnte *E.coli* jedoch auch in einer geringeren Keimzahl als 2×10^5 cfu/ml nachgewiesen werden (siehe 5.1.3.4). Dieser Sachverhalt spricht dafür, dass sich in der Bakterien-Präparation neben dem partikulären Antigen auch gelöstes Antigen in Form von Bruchstücken z.B. der Zellwand befanden.

Diese Annahme wurde experimentell dadurch gestützt, dass eine Bakterienpräparation (2×10^5 cfu/ml *E.coli*), welche filtriert wurde, gleichermaßen immunologisch nachgewiesen werden konnte wie unfiltriertes *E.coli*-Antigen. Dafür wurde der erste Ansatz als standardmäßiger Reaktionsmix angesetzt; für den zweiten wurde die Bakteriensuspension vor der Antigeninkubation durch einen $0,22 \text{ µm}$ Filter, welcher Bakterien abscheidet, filtriert. Trotz der Filtration ergaben sich für diesen Ansatz Signalintensitäten, welche mit dem unfiltrierten Ansatz vergleichbar waren (Daten nicht gezeigt). Dies belegt – zumindest für Bakterien – dass das lösliche im Vergleich zum partikulären Antigen für einen Großteil der Signale im immunologischen Nachweis verantwortlich ist.

Im Einzelfall ist daher für jedes in partikulärer Form (Virus- und Bakterienpräparation) eingesetzte Antigen abzuklären, inwieweit lösliche Antigene ebenfalls zur Signalintensität des immunologischen Arrays beitragen.

5.1.3 Immunologischen Einzelnachweis für Viren, Bakterien und Toxine mit dem AP[®]-System

5.1.3.1 Etablierung eines Alphavirus-Nachweises

Im Zuge erster Experimente mit dem AP[®]-System wurden für den Alphavirus-spezifischen Nachweis fünf WIS-eigene (P100, V100, V101, V102 und V-Mix) Fänger-Antikörper auf dem Biochip und vier monoklonale Nachweis-Antikörper (mAk), die ebenfalls aus der Ak-Stammsammlung des WIS stammten, ausgetestet. Diese getesteten Antikörper sind am WIS seit vielen Jahren für den spezifischen Alphavirus-Nachweis erprobt und geprüft. Zusätzlich wurden drei weitere kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper (V103, V104 und V105) als Fänger-Antikörper analysiert.

Durch Selektion der insgesamt acht getesteten Fänger- und vier erprobten Nachweis-Antikörper konnten für das AP[®]-System zwei Fänger- (V100 und V-Mix) und ein Nachweis-Antikörper (V109) ermittelt werden, die nachhaltig in der Lage waren, VEEV spezifisch und mit ausreichender Signalintensität ($\sim 0,15$) zu detektieren.

Der Nachweis des VEEV-Stammes TC-83, der einen attenuierten Lebendimpfstoff gegen VEEV darstellt, in der AP[®]-Kartusche gelang ausgehend von einem Virustiter von 4×10^8 KID₅₀/ml, sowohl in der 1:10 als auch in der 1:100 Verdünnung. Dieser Sachverhalt entspricht einer Nachweisgrenze des Virus von 2×10^5 KID₅₀ pro 50 µl Reaktionsansatz (Abbildung 12).

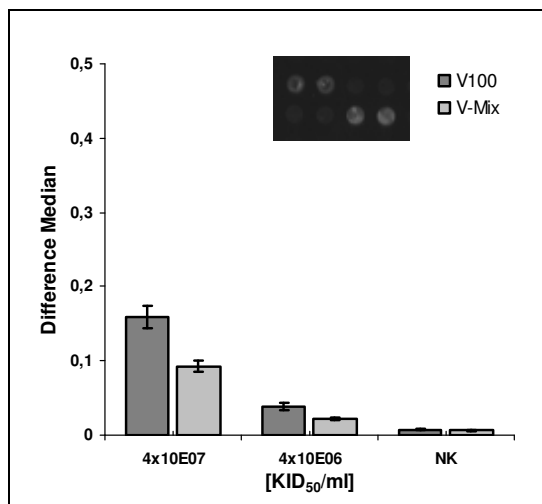


Abbildung 12: Titration von VEEV TC-83

Dargestellt sind die spezifischen Signale der Fänger-Antikörper V100 und V-Mix bei der Titration der VEEV TC-83-Charge mit dem Titer 4×10^8 KID₅₀/ml (Erklärung zur Auswertung siehe 4.1.9.4). Sowohl eine 1:10 als auch eine 1:100 Verdünnung waren mit V109-DyLight 649 als Nachweis-Antikörper zu detektieren.

Zusätzlich ist ein Ausschnitt des Protein-Microarrays nach dem Nachweis von 4×10^7 KID₅₀/ml VEEV abgebildet (WIS-Chip 14). Die beiden Spots oben links sind die spezifischen Signale des Fänger-Antikörpers V-Mix, die beiden Spots unten rechts die des Fänger-Antikörpers V100.

Von den acht als Fänger-Antikörper gespotteten Alphavirus-spezifischen Antikörpern ergaben nur V100 und V-Mix spezifische Signale bei einem VEEV-Nachweis mit dem DyLight-konjugierten Nachweis-Antikörper V109. Die im AP[®]-System erhaltenen Daten korrelieren mit den am WIS etablierten ELISA-Nachweisen für VEEV hinsichtlich der Fänger-Aks, die das höchste Signal aufweisen (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz zu den hier im AP[®]-System erhaltenen Daten liefern die übrigen VEEV-spezifischen Fänger-Antikörper (V101, V102, V103, V104 und V105) in anderen immunologischen Assays auf ELISA-Basis ebenfalls deutliche und spezifische Signale (HÜLSEWEH, B. (2007), persönliche Mitteilung). Anders als der Nachweis im AP[®]-System wird bei diesen immunologischen Reaktionen jedoch nicht auf Waschschrte nach Antigen- und Nachweis-Antikörper-Inkubation verzichtet.

Die beobachteten Unterschiede lassen sich möglicherweise auf die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der eingesetzten Antikörper zurückführen.

Im Hinblick auf die Nachweisgrenze ergab sich für den VEEV-AP[®]-Nachweis im Vergleich zum klassischen ELISA in der Mikrotiterplatte (MKT) eine um Faktor 40 (V100) bzw. eine um Faktor 5 (V-Mix) geringere Sensitivität. Der Zeitbedarf für den AP[®]-Nachweis betrug jedoch nur 30 Minuten im Vergleich zu drei bis sechs Stunden im MKT-ELISA.

Der Nachweis anderer Alphaviren wie CHIKV, EEEV und WEEV gelang ebenfalls mit den Fänger-Antikörpern V100 und V-Mix und dem Nachweis-Antikörper V109 (Abbildung 13). Allerdings konnte kein für jedes Alphavirus spezifisches Signalmuster im AP[®] generiert werden, welches eine genaue Unterscheidung zwischen den Alphaviren erlaubt.

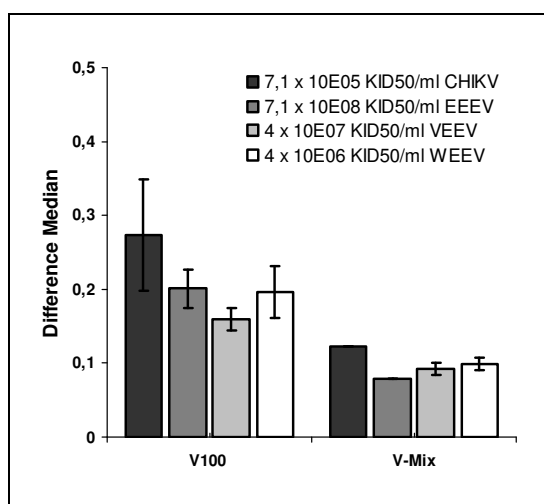


Abbildung 13: Immunologischer Nachweis verschiedener Alphaviren

Dargestellt sind die spezifischen Signale der Fänger-Antikörper V100 und V-Mix für den Nachweis einer 1:10 Verdünnung verschiedener Alphavirus-Präparationen (CHIKV, EEEV, VEEV und WEEV). Zu beachten ist, dass der Titer der vier Virusspezies bis um den Faktor 1000 variierte. Die Detektion erfolgte mit dem Nachweis-Antikörper V109-DyLight 649.

5.1.3.2 Etablierung eines Vaccinia-Virus-Nachweises

Für die Detektion des Orthopockenvirus VacV im AP[®]-System wurden ausschließlich Antikörper getestet, deren Spezifität im Sandwich-ELISA sichergestellt wurde (HÜLSEWEH, B. (2007), persönliche Mitteilung). Für das AP[®]-System wurden zwei WIS-eigene mAks (O100 und O101), ein polyklonaler (pAk) WIS-eigener Antikörper (O104) und zwei kommerziell erhältliche pAks (O102 und O103) in Kombination mit dem monoklonalen Nachweis-Antikörper O101 ausgetestet.

Laut Ergebnis diverser AP[®]-Analysen mit den Protein-Arrays 14 und 15 ergaben sich ausreichende und reproduzierbare Signalintensitäten nur bei Verwendung der monoklonalen Fänger-Antikörper O100 und O101. Die kommerziell erhältlichen Orthopocken-Antikörper erbrachten, als Fänger-Antikörper im AP[®]-System getestet, keine vergleichbaren Resultate.

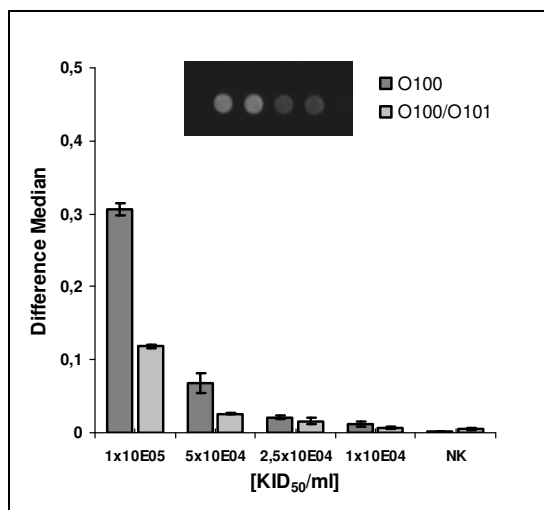


Abbildung 14: Titration des Vaccinia-Virus

Dargestellt sind die spezifischen Signale der Fänger-Antikörper O100 und O100/101 bei der Titration der VacV-Charge mit dem Titer 1×10^6 KID₅₀/ml. Das Virus konnte bis zu einer Verdünnung von 1:100 mit dem spezifischen NW-Ak b O101 und SA-DyLight 647 nachgewiesen werden.

Zusätzlich ist ein Ausschnitt des Protein-Microarrays nach dem Nachweis von 1×10^5 KID₅₀/ml VacV abgebildet (WIS-Chip 14). Die beiden Spots links sind die spezifischen Signale des Fänger-Antikörpers O100, die beiden Spots rechts die des Fänger-Antikörpers O100/O101.

VacV ließ sich mit b O101 als Detektionsantikörper bis zu einem Titer von 1×10^4 KID₅₀/ml nachweisen (Abbildung 14). Dies entspricht einer Nachweisgrenze des Virus von 5×10^2 KID₅₀ pro Kartusche. Mit vielen der gespotteten VEEV-spezifischen Fänger-Antikörper kam es zu massiven Kreuzreaktionen. Diese Kreuzreaktionen fielen bei geringerem Antigen-Titer im Reaktionsansatz deutlich stärker ins Gewicht (Daten nicht gezeigt).

Bei der Titration des spezifischen Antigens VacV im Reaktionsansatz war auffällig, dass die Signalintensitäten nicht proportional zum Titer abnahmen, sondern sich schon bei einer weiteren 2er-Verdünnung von 1×10^5 KID₅₀/ml auf 5×10^4 KID₅₀/ml um über 75 % des Ausgangswertes verminderten (Abbildung 14).

5.1.3.3 Flaviviren

Für den immunologischen Nachweis der Flaviviren YFV 17D und verschiedener Denguevirus-Stämme wurden sowohl ein Flavivirus- und ein Denguevirus-spezifischer als auch drei Denguevirus-Gruppen-spezifische Fänger-Antikörper in Kombination mit vier spezifischen Nachweis-Antikörpern ausgetestet. In keiner der durchgeführten Nachweis-Reaktionen konnte im AP[®]-System ein spezifisches Signal für den Nachweis von Gelbfieber- oder Dengueviren generiert werden.

5.1.3.4 Positivkontrolle *E.coli*

Um sicherzustellen, dass der Nachweis eines Erregers wirklich negativ ist und nicht das Nachweissystem (Gerät oder Reaktionsansatz) einen Fehler aufweist, muss bei jeder Analyse mit Hilfe einer Positivkontrolle die Funktionstüchtigkeit des Gerätesystems sichergestellt werden.

Ziel ist, diese Positivkontrolle bei jedem Nachweis durchzuführen, um für den Ernstfall falsch-negative Ergebnisse auszuschließen. Als Positivkontrolle für das AP[®]-System wurde ein Nachweis für *Escherichia coli* O157:H7 (*E.coli*) gewählt. Es handelt sich hierbei um ein am WIS lang etabliertes stabiles immunologisches Nachweissystem mit hoher Sensitivität. Sowohl das benötigte Antikörper-Pärchen aus Nachweis- und Fänger-Antikörper als auch das Antigen, sind kommerziell erwerbbar. Das hitzeinaktivierte Antigen von *E.coli* O157:H7 ließ sich mit dem biotinylierten mAk E2 (1:200) ohne weiteres bis zu einer 1:100000 Verdünnung (2×10^3 cfu/ml) nachweisen, was einer Nachweisgrenze von 1×10^2 cfu pro Kartusche entspricht (Abbildung 15). Anhand der gewonnenen Daten wurde entschieden in den nachfolgenden Experimenten die Positivkontrolle mit einer Keimzahl von 2×10^5 cfu/ml einzusetzen.

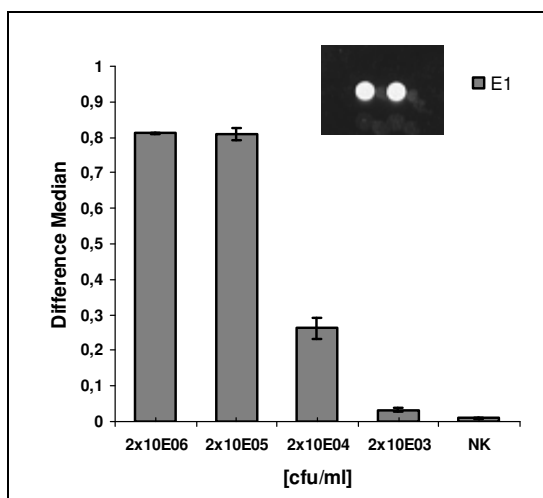


Abbildung 15: Titration der Positivkontrolle *E.coli*

Dargestellt sind die spezifischen Signale des Fänger-Antikörpers E1 bei der Titration der Positivkontrolle *E.coli* O157:H7 mit dem Titer 2×10^8 cfu/ml. Das Bakterium konnte bis zu einer Verdünnung von 1:100000 mit dem spezifischen NW-Ak b E2 und SA-DyLight 647 nachgewiesen werden.

Zusätzlich ist ein Ausschnitt des Protein-Microarrays nach dem Nachweis von 2×10^6 cfu/ml *E.coli* abgebildet (WIS-Chip 14). Die beiden Spots sind die spezifischen Signale des Fänger-Antikörpers E1.

5.1.3.5 Toxinnachweis – Ricin

Beim immunologischen Nachweis von Ricin ist bezüglich des eingesetzten Antigens zwischen dem Roh toxin und dem Reintoxin zu unterscheiden. Das Roh toxin wird durch eine wässrige Extraktion der Ricinus-Bohne gewonnen und besteht aus dem Reintoxin (RCA60), dem Agglutinin (RCA120) und allen weiteren Protein-Bestandteilen der Samen. Die photometrisch durchgeführte Konzentrationsbestimmung erfasst somit alle Komponenten der Toxin-Präparation. Das Reintoxin wird durch weitere Aufreinigungsschritte über eine Anionenchromatographie- und Größenausschlusschromatographie-Säule hergestellt und besteht nur noch aus RCA60. Eine Einstellung des Toxins auf 1 mg/ml und eine anschließende Verdünnung ergibt somit aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung von Roh- und Reintoxin keinen miteinander vergleichbaren Toxingehalt. Sowohl das Roh- als auch das Reintoxin wurden durch Jörn-Ulrich Heinrich (Geschäftsfeld 220 (B-Detektion) des WIS) präpariert und zur Verfügung gestellt.

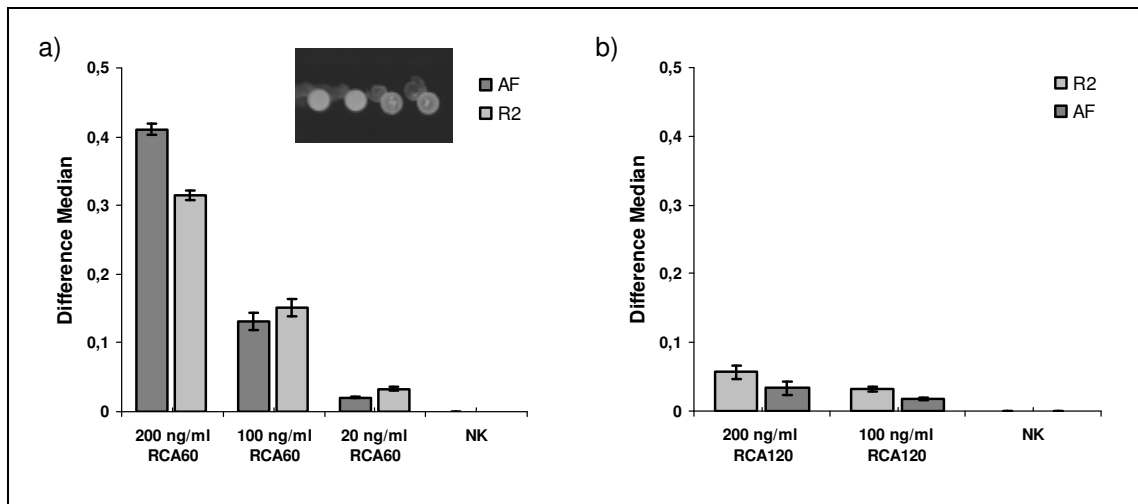


Abbildung 16: Titration von Reintoxin RCA60 und Roh toxin RCA120

Dargestellt sind die spezifischen Signale des Fänger-Moleküls Asialofetuin (AF) und des Fänger-Antikörpers R2 bei der Titration von Ricin. Das Reintoxin RCA60 ließ sich bis zu einer Konzentration von 20 ng/ml nachweisen (a), das Roh toxin RCA120 nur bis 100 ng/ml (b). Der spezifische Toxinnachweis erfolgte mit dem NW-Ak b R1 und SA-DyLight 647.

Zusätzlich ist ein Ausschnitt des Protein-Microarrays nach dem Nachweis von 200 ng/ml RCA60 abgebildet (WIS-Chip 15). Die beiden Spots links sind die spezifischen Signale des Fänger-Moleküls AF, die beiden Spots rechts die des Fänger-Antikörpers R2.

Das Reintoxin RCA60 konnte bis 20 ng/ml mit dem Antikörper b mAk R1 nachgewiesen werden (Abbildung 16a), wohingegen das Roh toxin bei einer berechneten Konzentration von 200 und 100 ng/ml nur einen Bruchteil der Signale im Vergleich zum Reintoxin ergab (Abbildung 16b). Als Grund dafür kann die oben genannte unterschiedliche Zusammensetzung beider Toxin-Präparationen angeführt werden. Eine weitere Ursache für die stark differierenden Signalintensitäten kann die unterschiedliche Aufbewahrung und Lagerung der Antigene

darstellen. Das Reintoxin wurde bei -20°C im Tiefkühlschrank gelagert, wohingegen das Rohtoxin bei -20°C lyophilisiert aufbewahrt und erst kurz vor dem Versuch mit Reinstwasser rekonstituiert wurde. Es besteht die Möglichkeit, dass durch die Gefriertrocknung die Antigenität des Rohtoxins verändert bzw. geschädigt oder zerstört wurde.

5.1.4 Immunologische Multiplex-Versuche mit dem AP[®]-System

Neben der Detektion verschiedener Antigene im Einzelnachweis, war die Etablierung der parallelen Detektion von Viren, Toxinen und Bakterien im AP[®]-System das Ziel. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe vorgefertigter Biomixe, die alle Bestandteile des Reaktionsansatzes inklusive der optimierten Nachweis-Antikörper-Mengen beinhalteten. Diese Handhabung des immunologischen Nachweises verspricht insbesondere für den Feldeinsatz eine Vereinfachung und ist erforderlich, da beim Verdacht eines B-Waffen-Angriffes das ausgebrachte Agens meist unbekannt ist und somit die BWA-Identifizierung mit allen zur Verfügung stehenden Nachweisen durchgeführt werden muss.

Waren im Reaktionsansatz zwei B-Agenzien und deren entsprechende Nachweis-Antikörper vorhanden, wird im Nachfolgenden von einem Duplexnachweis oder Duplex gesprochen. Das gleiche gilt für den Nachweis im Triplex mit drei B-Agenzien und ihren spezifischen NW-Antikörpern.

Im Folgenden sind die getesteten Antigen-Kombinationen zusammengefasst und ausgewertet (Daten nicht gezeigt). Die Nachweis-Antikörper wurden in derselben Verdünnung wie im Einzelnachweis eingesetzt.

Duplex:

1. 200 ng Ricin (Reintoxin) und 2×10^5 cfu/ml *E.coli*: Im Duplex konnten die im Singleplex-Nachweis detektierten Signalintensitäten von *E.coli* und Ricin nicht reproduziert werden. Die spezifischen Ricin-Signale waren im Duplex um 5 bis 14 % höher als im Einzelnachweis, wohingegen die Signalhöhe der Positivkontrolle auf 16 % des Singleplex-Signales einbrach. Die Erhöhung der *E.coli*-Antigen-Menge auf 2×10^6 cfu/ml verstärkte diesen Effekt zusätzlich. Der Nachweis des Ricins im Duplex scheint somit die Detektion der Positivkontrolle *E.coli* zu hemmen.
2. $7,1 \times 10^7$ KID₅₀/ml VEEV TC-83 und 2×10^5 cfu/ml *E.coli*: Der parallele Nachweis der Positivkontrolle und des VEE-Virus TC-83 führte zu einem Signalabfall um über 70 % bei *E.coli* und um über 50 % bei VEEV im Vergleich zum Einzelnachweis. Der Signaleinbruch bei *E.coli* ist mit dem bei der parallelen Detektion mit Ricin vergleichbar.

3. 200 ng/ml Ricin (Reintoxin) und $7,1 \times 10^7$ KID₅₀/ml VEEV TC-83: Dieser Parallelnachweis ging ebenfalls mit einem deutlichen Signalverlust einher. Die Signale fielen um über 70 % (Ricin-Fänger-Antikörper) bzw. um knapp 95 % (VEEV-Fänger-Antikörper). Während Ricin noch nachweisbar war, näherten sich die Signale des VEEV-Nachweises der derzeitigen Detektionsgrenze an.
4. 1×10^5 KID₅₀/ml VacV und $7,1 \times 10^7$ KID₅₀/ml VEEV TC-83: Im Parallelnachweis der beiden BWA-relevanten Viren sanken die Signale der Orthopocken-Fänger-Antikörper auf denselben Wert der VacV-Hintergrundsignale beim Einzelnachweis von VEEV. Die leichte Signalsteigerung bei den VEEV-Fängern im Duplex mit VacV im Vergleich zum Einzelnachweis von VEEV ist auf die Kreuzreaktivität der Alphavirus-spezifischen Fänger-Antikörper V100 und V-Mix mit dem Vaccinia-Virus zurückzuführen.

Triplex:

1. 200 ng Ricin (Reintoxin), 2×10^5 cfu/ml *E.coli* und 1×10^5 KID₅₀/ml VacV: VacV konnte nicht in Kombination mit *E.coli* und Ricin nachgewiesen werden. Der Nachweis von Ricin gelang dagegen auch mit *E.coli* und VacV im Reaktionsansatz. Die Signalintensitäten für Ricin waren im Triplex mit denen im Duplex mit *E.coli* vergleichbar. Auf die Positivkontrolle wirkte sich das zusätzliche Antigen (VacV) dahingehend aus, dass kein positives *E.coli*-Signal mehr zu detektieren war. Die schon in Kombination mit Ricin schwache Signalausbeute von E1 im Vergleich zum Einzelnachweis sank bis an die derzeitige Detektionsgrenze.
2. 200 ng Ricin (Reintoxin), 2×10^5 cfu/ml *E.coli* und $7,1 \times 10^7$ KID₅₀/ml VEEV TC-83: Das Signal der Positivkontrolle verhielt sich in diesem Triplex wie in dem vorherig durchgeführten Parallelnachweis dreier Antigene. Das Fluoreszenzsignal von E1 sank bis zur Nachweisgrenze. Bei den Ricin-Fängern kam es zu einem Signlrückgang um durchschnittlich 25 %. Für diesen Rückgang scheint der Zusatz des VEEV-Antigens verantwortlich zu sein, welcher bereits im Parallelnachweis von Ricin und VEEV zu beobachten war. Ein durch die Zugabe von Ricin verursachter Signalverlust wurde im Triplex bei den Fängern V100 und V-Mix ebenfalls gemessen – es kam zu einem ca. 95 %igen Signalverlust.

5.2 Molekularbiologischer Virusnachweis mit dem AP[®]-System

5.2.1 Sondenkonzipierung für das AP[®]-System

Im Folgenden sollen am Beispiel des Alphavirus VEEV die Herangehensweise und die Ergebnisse bei der Planung und Entwicklung spezifischer Primer und Sonden für die molekularbiologische Virusdetektion und -identifikation dargestellt werden.

Das E1- bzw. E2-Gen codiert für das Oberflächen-Glycoprotein E1 bzw. E2 der Alphaviren und ist innerhalb der einzelnen Alphavirus-Spezies stark konserviert. Über diese Genabschnitte lassen sich die verschiedenen VEEV-Stämme differenzieren, zudem erlaubt die hohe Homologie in einigen Bereichen die speziesspezifische Detektion dieser Gene. Zwischen den berücksichtigten VEEV-Stämme TrD und TC-83 des Subtyps IAB (Tabelle 13) liegt auf Nukleinsäureebene sowohl im E1-Gen als auch im E2-Gen eine Homologie von 99 % vor. Die vier VEEV-Stämme der serologischen Gruppe IC (P676, 243937, SH3 und V198) weisen im E1-Gen untereinander eine Homologie zwischen 97 % und 99 % auf, im E2-Gen variiert die Homologie zwischen 96% und 99 %. Die Homologie im E1-Gen der VEEV ID-Stämme 3880 und 8131 liegt bei 98 % und im E2-Gen bei 97 %.

Vergleicht man die E1- und die E2-Gene der verschiedenen betrachteten VEEV-Stämme der antigenischen Subgruppen IAB, IC und ID so liefert der Homologievergleich für das E1-Gen eine Übereinstimmung von 92,4 % und für das E2-Gen von 87,9 %.

Für die Konzipierung des forward und reverse Primers als auch einer Consensus-Sequenz als Fängersonde wurde im Falle der verschiedenen Alphavirus-Spezies ein Gen gewählt, das möglichst wenige Basen-Abweichungen zur Nukleinsäuresequenz der einzelnen Virusstämme aufweist. Somit ist es möglich mit nur einem Primerpaar ein für jedes VEE-Virus spezifisches PCR-Produkt zu amplifizieren und über die Consensus-Sonde zunächst eine speziesspezifische Identifikation (Consensus-Sonde) und mit diversen stammspezifischen Fängersonden eine genaue Einordnung in die unterschiedlichen VEEV-Stämme bzw. antigenischen Varianten durchzuführen.

In Abbildung 17 und Abbildung 18 sind die multiplen Sequenzalignments der acht sequenzierten, humanpathogenen VEEV-Stämme aus Tabelle 13 für das E1- und das E2-Gen dargestellt. Mit Hilfe des Consensus-Programms des EMBL wurde von diesen Nukleinsäuren eine Consensus-Sequenz erstellt, in der sich nicht deckende Nukleotide der viralen Genomsequenzen durch ein N gekennzeichnet wurden. In dieser Arbeit galt u.a. zu prüfen, ob durch eine zweckmäßige Auswahl der Fängersonden die Möglichkeit besteht, die verschiedenen VEEV-Stämme voneinander zu unterscheiden.

```

10001   tacgagcacgcgaccacgatgccgagccaagcgggaatcNcgtataaacacNatagtcaaca
gagcaggctacgcNccactccctatcagcataaacaccNacaaagatcaagctgataccNacagtgaact
tgagtagctcacctgccactacaaNacaggaatggattcaccagccatNaaatgctgcggtacNcagg
aatgNactccaactNacagNcctgatgaacagtgcaaagtNttNacaggggtNtacctNttcatgtggg
gNggNgcatattgcttttgcgacactgagaaNacNcaNgtcagcaaggcNtaNgtaatgaaatctgacg
actgccttgcNgaNcaNgctgaagcataNaaagcgacacagcctcagtgcaggcggttcctcaacatca
cNgtgggNgaacaNtcNatNgtgacNacNgtgtatgtgaatggagaaactccNgtNaaNttcaaNgggg
tcaaaNtaactgcaggNccNctttccacagcttggacaccNtttgaNNgNaaaatNgtgcagtatgccg
gggagatctaNaaNtaNgattttcctgagtaNggggcaggacaNccaggagcNtttggagaNatacaat
ccagaacNgtNtcaagctcNgatctgtaNgccaaNaccaaNctagtgtgcagagacccaaagcaggag
cgatccaNgtgccatacacNcaggcNccNtcgggttttgagcaatggaagaaagataaNgtcccNtcat
tgaaattNacNgccccctttNggatgNgaaatatatacaaacccattcgcgccgaaaaNtgtgtgtNg
gggtcaattccattagcctttgacatNccNgacgccttggtNaccaggggtgtcagaaacaccgacactNt
cagcggccgaatgcactcttaaNgagtgcgtgtattcNtccgactttggNgggatcgccacNgtcaagt
aNtcggccagcaagtcaggcaaNtgNgcagtcctatgtgccatcagggaNgcNaccctaaaagaagcag
caNtcgagNtaNccgagcaagggtcggNgacNatNcatttctcgacNgcaaaNatccaccggagttca
ggctccaaatatgcacatcatNNgtNacgtgcaaagggtgattgtcacccccgaNagaccaNattgtga
cacaccNcagtatcacgccccaaacatttacagccgcggtgtcaaaaaccgctggacgtggttaacat
ccctgctgggaggatcNgcNgtaattattataaattggcttNgtgctggctactattgtggccatgtacg
tNctgaccaaccagaaacataat   11326

```

Abbildung 17: Consensus-Sequenz des VEEV E1-Gens unter Berücksichtigung der in Tabelle 13 aufgeführten Vertreter der serologischen Gruppen IAB, IC und ID

Die Consensus-Sequenz (<http://coot.embl.de/Alignment/consensus.html>) des E1-Gens erstreckt sich innerhalb des VEEV TC-83 Virusgenoms von Position 10001 bis 11326 und ist 1326 nt lang. Nukleotide, welche zwischen den VEEV-Stämmen divergieren, sind durch ein N gekennzeichnet. Das 131 bp lange entstehende PCR-Amplikon im E1-Gen ist grau unterlegt.

```

8564   tcNacNgaggagNtggtttaaNagagtaNaagctaacgcgNccNtacetggcNagatgNatNag
NtgNgcNgttgggagctgccatagccaatagcaatNgaggcagtNaagagNgacgggcacgcagcggNta
tgtNagactNcagacttcctcNcagtaNggcctggaNtcNtcNggcaacttaaaNggNaggacNatgcg
gatatgaNatgcacgggaccattNaagagataccNtacetcaagtgtcactNNAcacetctcgcccggtg
tcacattgtggatgggcaNggNtaNttNNTgcttgNagNtgcccggcaggggaNtccatcaccatgga
atthaagaaaNNTNcNgtcaNacaNtcctgctcNgtgctgatgaagtgaatttaattcctgtaggcag
agaactctaNactcaNccNccagaacacggagNagagcaagcgtgccagtctaNgcNcaNgatgcNca
gaacagaggagcNtatgtcgagatgcacctccgggctcNgaagtgggNagcagtNtgNtNtcNttgag
cggNagttcagtcacNgtgacacctcctgNNNggacNagcgccNtggtggaatgcNagtNggNggcac
aaagatctccgaNaccatcaacaNgNcaaacagttcagccagtgcaaaagaaggagcagtgNagagc
atatcgNctgcagaaNganaNtggtgtataattcNgacaaaNtgcccaaagcNgcgggagccacNNT
aaaaggaaaaNtNcaNgtNccNttcttctgctggcagacggcaaatgNacNgtgctctNgcaccNgaacc
NatgataaccttNggNttcNgtcNgtgtcactgaaactgcacccNaagaatcccacatatNtNaNNac
NcgccaacttNctgatgagcctcaNtacacgcacgagctcatatctgaaccNgNtggttaggaaNtttNc
NgtcacNgaaaaNggNtgaggagtttgatggggNaaccaNccgcgaaaagggttttgggcacaggaaac
agcNcccggNaatccacatgggctNccNcaNgaggtgataactcattattaccacagatacccNatgtc
cacNatcNtggtttgtcaatNtgNgcgcgatNgNNaccgtttcNNTNgcagcgtcNacNtggtgtt
NtgcaNatcNagagtNncgtgcctaactccttaccggctaacaccNaacgcNaggatNccNNTNtgNct
ggcNgtgctttgctgNgcNcgNactgcccNgcc   9832

```

Abbildung 18: Consensus-Sequenz des VEEV E2-Gen unter Berücksichtigung der in Tabelle 13 aufgeführten Vertreter der serologischen Gruppen IAB, IC und ID

Die Consensus-Sequenz (<http://coot.embl.de/Alignment/consensus.html>) des E2-Gen erstreckt sich innerhalb des VEEV TC-83 Virusgenoms von Position 8564 bis 9832 und ist 1269 nt lang. Nukleotide, welche zwischen den VEEV-Stämmen divergieren, sind durch ein N gekennzeichnet. Das 182 bp lange entstehende PCR-Amplikon im E1-Gen ist grau unterlegt.

Die Consensus-Sequenzen, welche sich für das E2-Gen von VEEV TC-83 über die Nukleotide 8564 bis 9832 (Länge: 1326 nt) und für das E1-Gen über die Nukleotide 10001 bis 11326 (Länge: 1269 nt) erstrecken, und die durchgeführten Alignments wurden genutzt, um für beide Genabschnitte unter den in Tabelle 18 genannten Bedingungen sowohl die forward und reverse Primer als auch die Consensus- und die – die verschiedenen Virusstämme differenzierenden – Hybridisierungssonden auszuwählen.

Tabelle 18: Parameter für den Entwurf der Consensus-Primer und Hybridisierungssonden

Parameter für Consensus-Primer	Parameter für Sonden
Schmelztemperatur T_m : 58 – 60 °C	Schmelztemperatur T_m : 58 – 63 °C
GC-Gehalt: 35 – 60 %	GC-Gehalt: 35 – 60 %
Primerlänge: 18 – 30 nt	Sondenlänge: 22 – 30 nt
Amplikonlänge: 80 – 200 nt	

Für die Amplifikation in der AP[®]-Kartusche wurde im E1-Gen der Bereich von Base 10328 bis 10458 (Amplikonlänge: 131 bp) und im E2-Gen der Bereich von Base 9412 bis 9593 (Amplikonlänge: 182 bp) gewählt, dieser ist in den gezeigten Consensus-Sequenzen jeweils grau unterlegt dargestellt (Abbildung 17 und Abbildung 18).

Parallel zu den Consensus-Sequenzen wurden virusstammspezifische Sonden mit Hilfe der Genomalignments für die folgenden VEEV-Stämme erarbeitet: im E1-Gen für TC-83, V198, SH3 und 3880; im E2-Gen für TC-83, Trinidad Donkey, 243937, V198, 8131 und 3880. Die PCR-Reaktion für den Nachweis aller berücksichtigten VEEV-Stämme kann im E1- bzw. E2-Gen mit je einem spezifischen Primerpaar durchgeführt werden, dabei wird ein Amplikon generiert, welches sowohl an die virusstammspezifische als auch an die Consensus-Hybridisierungssonde binden kann.

In Abbildung 19 und Abbildung 20 sind die durch die spezifischen Primer entstehenden Amplikons im E1- und E2-Gen für den VEE-Virusstamm TC-83 (L01443) mitsamt der Bindungsstellen der stammspezifischen Fängersonde und der Consensus-Sonde angegeben.



Abbildung 19: Mit den spezifischen Primern im E1-Gen gebildetes Amplikon bei VEEV TC-83

Dargestellt ist das mit den spezifischen Primern in der RT-PCR gebildete doppelsträngige Amplikon für VEEV TC-83 im E1-Gen. Zusätzlich sind die Bindungsstellen für den forward (blau: VEE109_E1) und reverse Primer (rot: VEE111_E1) als auch die TC-83-spezifische (gelb: E1_V3) und Consensus-Sonde (gelb: E1_cons_iab_ic_id) veranschaulicht.

		VEE112_E2			E2_V3
		gtcactgaaactgcaccc			ctaagaatcccacatatctaatacaccgcgc
3'		cagtgactttgacgtgggattcttaggggtgtatagattagtgggcgg			
5'	9412	gtcactgaaactgcaccctaagaatcccacatatctaatacaccgcgc			9458
				E2_cons_ia_ic_id	
				cacgcacgagctcataatctgaacc	
3'		ttgaacgactactcggagtgatgtgcgtgctcgagtatagacttgg			
5'	9459	aacttgctgatgagcctcactacacgcacgagctcataatctgaacc			9504
3'		tcgacaatccttaaaatggcagtggtttttccaccctcaaacata			
5'	9505	agctgttaggaattttaccgtcaccgaaaaagggtgggagtttgat			9551
3'		cccctttcctgggcggccttttccaaaaccgtgtcctttgtc	5'		
5'	9552	ggggaaaccacccgccgaaaagggttttgggcacaggaaacag	3'	9593	
		aaaacccgtgtcctttgtc			(Pos. im
		VEE114_E2.2_Cy5			Genom)

Abbildung 20: Mit den spezifischen Primern im E2-Gen gebildetes Amplikon bei VEEV TC-83

Dargestellt ist das mit den spezifischen Primern in der RT-PCR gebildete doppelsträngige Amplikon für VEEV TC-83 im E2-Gen. Zusätzlich sind die Bindungsstellen für den forward (blau: VEE112_E2) und reverse Primer (rot: VEE114_E2.2) als auch die TC-83-spezifische (gelb: E2_V3) und Consensus-Sonde (gelb: E2_cons_ia_ic_id) veranschaulicht.

Für den Nachweis von WEEV im E1- bzw. E2-Gen wurde mittels Alignment je ein Primerpaar (forward und reverse) und eine Consensus-Sonde für die WEEV-Stämme McMillan (AF229608), Fleming (DQ393791), 71V-1658 (NC003908), California (DQ393790), Mn520 (DQ393793), Mn548 (DQ393794), B11 (DQ432027) und CBA87 (DQ432026) ausgearbeitet. Virusstammspezifische Fängersonden wurden für folgende WEEV-Stämme konzipiert: im E1-Gen für CBA87, McMillan, Fleming, 71V-1658, Mn520 und B11; im E2-Gen für Mn548, 71V-1658, Fleming, California und McMillan.

Für die Detektion von EEEV (ab WIS-Chip 18 AP[®]) wurden für das E1-Gen fünf und für das E2-Gen vier Hybridisierungssonden auf dem Microarray immobilisiert. Diese wurden zum 5'- bzw. 3'-Ende variiert, so dass das in der PCR generierte Amplikon bei der Hybridisierung in verschiedenen Regionen gebunden werden kann. Bei dieser Art der Konzeption der Hybridisierungssonden kann u.U. eine Aussage über die optimale Position der Sonde am Amplikon getroffen werden, welche dann bei zukünftigen Optimierungsarbeiten herangezogen werden kann.

Die Sonden für den OPV-, WNV- und YFV-Nachweis wurden analog entworfen, dabei konnte auf Daten von bereits im Biologischen Zentrallabor (Abteilung Virologie) des WIS etablierten real-time PCR und RT-PCR Nachweisen zurückgegriffen werden. Der zu detektierende Genabschnitt bei OPV erstreckt sich über das 14 kDa cell fusion protein, bei WNV über die 3'-UTR (*untranslated region*) und bei YFV über die 5'-UTR.

Nach dem Austesten der verschiedenen Virussonden für den spezifischen Nachweis von Alpha-, Flavi- und Orthopockenviren hinsichtlich ihrer Spezifität und Sensitivität auf den Chip-Chargen WIS-Chip 17 AP[®] und 18 AP[®] wurden die Hybridisierungssonden für die nachfolgenden AP[®]-Chips verändert. Sonden, welche keine ausreichend hohen spezifischen Signalintensitäten erzeugten, wurden nicht mehr auf den Biochip gespottet und durch neu konzipierte Oligonukleotide ersetzt. Diese wurden dabei in ihrer Bindungsposition innerhalb des in der RT-PCR oder PCR generierten Amplikons zum 5'- bzw. 3'-Ende variiert (siehe 5.2.4.7).

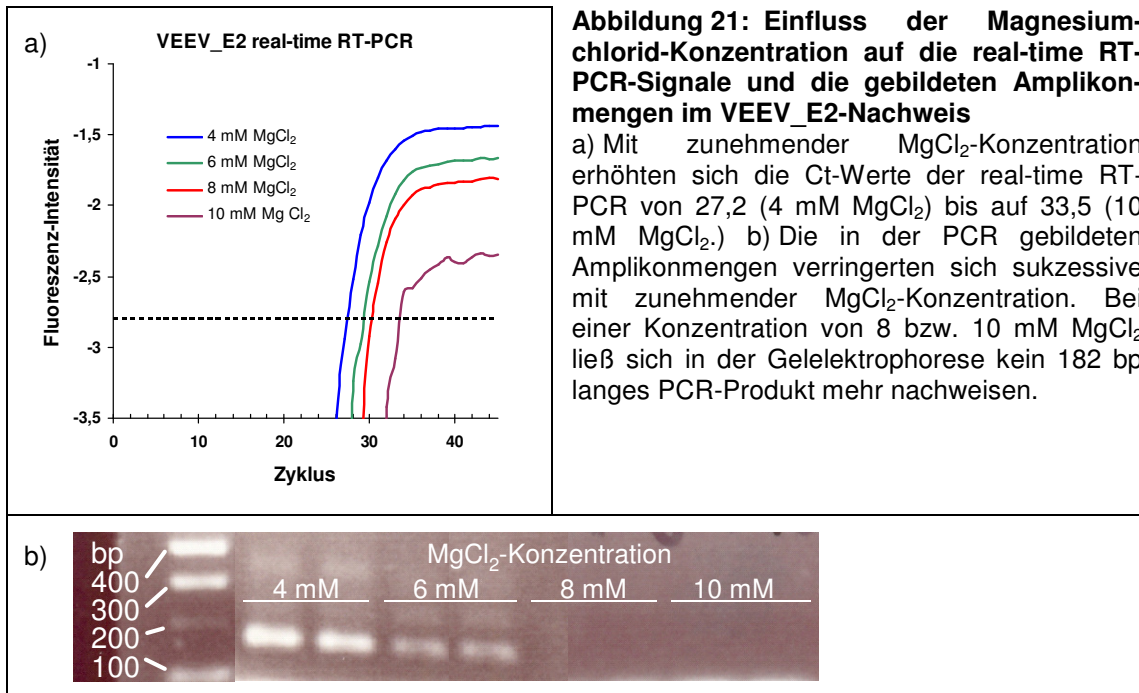
5.2.2 Optimierung der Magnesiumchlorid- und Primerkonzentration in der RT-PCR bzw. PCR

Mit Etablierung der viralen AP[®]-Nachweise wurde zunächst die RT-PCR bzw. PCR optimiert, um sicherzustellen, dass für alle Nachweise mit den ausgewählten spezifischen Primern (i) ausreichend und (ii) das jeweils korrekte Amplikon für die Hybridisierung in der Kartusche gebildet wird. Die Vorarbeiten hierzu wurden auf dem Opticon-PCR-Gerät der Firma Bio-Rad durchgeführt und auf die Kartusche übertragen. Die Optimierung der MgCl₂- und der Primerkonzentration erfolgte für die Nachweise der Alphaviren EEEV, VEEV und WEEV jeweils im E1- und E2-Gen. Für die Flavi- und die Orthopockenviren konnte auf bereits in der Vergangenheit durch das Biologische Zentrallabor des WIS etablierte Nachweis-Reaktionen zurückgegriffen werden.

Im Rahmen der Optimierung der verschiedenen Alphavirus-Nachweise wurde eine Reihe von Parametern in der real-time RT-PCR ausgetestet und gleichzeitig die Produktbildung mittels Gelelektrophorese überprüft. Für jede einzelne Nachweis-Reaktion wurde die MgCl₂-Konzentration in einem Bereich zwischen 4 und 12 mM in 2 mM-Schritten titriert.

Magnesium stellt einen wichtigen Co-Faktor für die DNA-Polymerase dar, der bei zu niedriger Konzentration eine geringe Ausbeute und bei zu hoher Konzentration die Blockierung des Zugangs zur DNA zu Folge hat [204,205].

Die optimale Magnesium-Konzentration variierte je nach Nachweis von 4 mM (z.B. VEEV_E2) bis 12 mM MgCl₂ (z.B. EEEV_E1). In Abbildung 21 sind exemplarisch für den VEEV-Nachweis im E2-Gen die real-time Fluoreszenzsignale und die in der RT-PCR gebildeten Produktmengen in Abhängigkeit von der Magnesiumchlorid-Konzentration dargestellt.



Neben der $MgCl_2$ -Konzentration kann die Konzentration der Primer die Produktausbeute in der PCR beeinflussen. Daher wurde für alle relevanten Reaktionen der optimale Gehalt von forward und reverse Primer im RT-PCR- bzw. PCR-System ermittelt. In den untersuchten Nachweis-Reaktionen wurden die Primer in den Konzentrationen von 100, 200 und 400 nM eingesetzt und gegeneinander titriert. Anhand der Ct-Werte im real-time-System und den im Agarosegel ausgewerteten Produktmengen ergaben sich die in Tabelle 19 aufgeführten optimalen $MgCl_2$ - und Primerkonzentration der einzelnen Virusnachweise.

Tabelle 19: In der RT-PCR bzw. PCR optimierte Magnesium- und Primerkonzentrationen für den Nachweis von DNA- und RNA-Viren

Virusnachweis (Amplikonlänge)	$MgCl_2$ in [mM]	Primer in [nM]	
		forward	reverse
EEEV_E1 (101 bp)	12	200	200
EEEV_E2 (106 bp)	10	200	200
VEEV_E1 (131 bp)	8	200	200 bzw. 400
VEEV_E2 (182 bp)	4	200	200 bzw. 400
WEEV_E1 (139 bp)	6	200	400
WEEV_E2 (173 bp)	8	200	200 bzw. 400
WNV (102 bp)	4	200	200
YFV (103 bp)	4	200	200
OPV (145 bp)	8	200 bzw. 400	200

Anhand der Ergebnisse der Primerkonzentration-Titration wurde entschieden, die molekularbiologischen Nachweisreaktionen in der AP[®]-Kartusche zunächst mit einer Primerkonzentration von je 200 nM für forward und reverse Primer durchzuführen.

In Abbildung 22 sind die virusspezifischen PCR-Amplikons der in Tabelle 19 genannten optimierten Virus-Einzelnachweise, welche in einem Agarosegel aufgetrennt wurden, dargestellt. Die in der RT-PCR bzw. PCR gebildeten Produkte entsprachen in ihrer Länge den erwarteten Größen. Für EEEV wurde ein 101 bp (E1-Gen) bzw. 106 bp (E2-Gen) langes PCR-Produkt amplifiziert, für VEEV ein 131 bp (E1-Gen) bzw. 182 bp (E2-Gen) langes Amplikon und für WEEV ein 139 bp (E1-Gen) bzw. 173 bp (E2-Gen) langes PCR-Produkt gewonnen. Die Amplifikation der spezifischen Genabschnitte für die Flaviviren WNV und YFV resultierte ebenfalls in den korrekten Amplikonlängen (WNV in der 3'-UTR: 102 bp; YFV in der 5'-UTR: 103 bp). VacV, als einziges DNA-Virus, konnte ebenso über einen 145 bp langen spezifischen Genabschnitt im Gen des *14 kDa cell fusion proteins* amplifiziert werden (Abbildung 22).

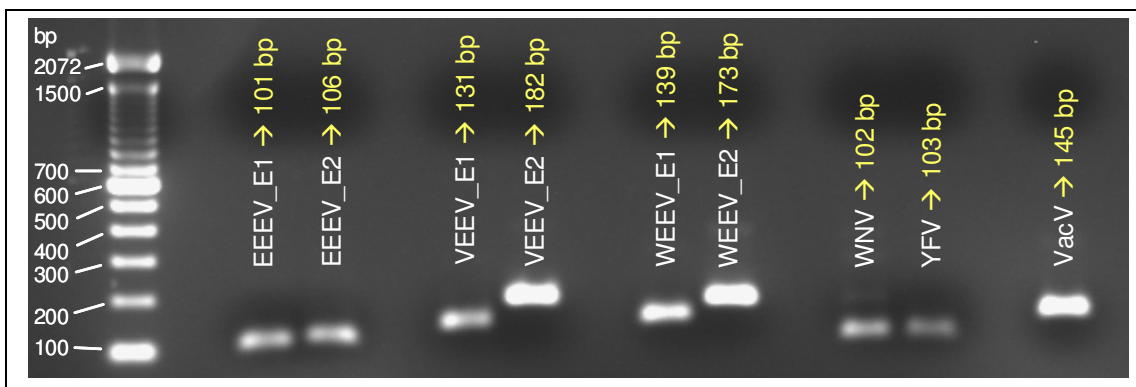


Abbildung 22: Kontrolle der Amplikonlängen der RT-PCR- bzw. PCR-Produkte im Agarosegel

Die einzelnen Nachweise der Alpha-, Flavi- und Orthopockenviren wurden unter den vorher optimierten MgCl₂-Konzentrationen durchgeführt. Anhand des mitgelaufenen Markers im 1,8 %igen Gel ist ersichtlich, dass die Amplikonlängen den erwarteten Größen entsprachen.

Die in der PCR bzw. RT-PCR durchgeführten Optimierungsschritte bezüglich der MgCl₂- und Primerkonzentration erlauben eine Abschätzung über die Effektivität der molekularbiologische NW-Reaktionen in der AP[®]-Kartusche, allerdings ist eine Korrelation zwischen der Höhe des Signals der TaqMan-Sonde im real-time-System und der Cy5-Signalintensität nach der erfolgten Virusnachweis-Reaktion im AP[®]-System nicht möglich.

5.2.3 Austesten verschiedener RT-PCR- und PCR-Kits

Verschiedene Firmen bieten diverse Kits für PCR- und RT-PCR-Anwendungen an. Im Rahmen der Optimierung der Virusnachweise wurde eine Reihe dieser Kits mitsamt der spezifisch etablierten Temperaturprofile getestet, wobei es sich um PCR- (Phusion, HotStarTaq), RT-PCR- (OneStep, QuantiTect, Platinum Quantitative, QuantiFast), aber auch um RT-PCR-Multiplex-optimierte (QuantiTect Multiplex) bzw. auf den Virusnachweis-ausgelegte (QuantiTect Virus) Kits handelte. Die Titration der optimalen $MgCl_2$ -Konzentration erfolgte für die RNA-Viren mit dem QuantiTect- bzw. OneStep RT-PCR-Kit (Qiagen), für die DNA-Viren mit dem Phusion-Kit (Finnzymes). Als optimal in der Produktausbeute und der Spezifität der RT-PCR- bzw. PCR-Reaktion erwiesen sich für den Nachweis von RNA-Viren das OneStep-RT-PCR-Kit (Qiagen) und für die DNA-Viren das Phusion-Kit (Finnzymes). Das Vaccinia-Virus ließ sich mit dem OneStep-RT-PCR-Kit in einer mit dem Phusion-Kit vergleichbaren Produktmenge nachweisen, daher wurden alle nachfolgenden Reaktionen mit dem OneStep-RT-PCR-Kit durchgeführt.

5.2.4 Optimierung des molekularbiologischen Virusnachweises im AP[®]-System

Das AP[®]-System erlaubt sowohl den immunologischen Nachweis von Antigenen als auch die molekularbiologische Detektion verschiedener Organismen in einem System. Dabei verlangt der molekularbiologische Nachweis von DNA- und RNA-Viren im AP[®]-System die Kombination zweier molekularbiologischer Prozesse in einer Reaktionskammer: der PCR bzw. RT-PCR und der anschließenden Hybridisierung der PCR-Produkte mit den auf dem Chip immobilisierten virusspezifischen Sonden. Beim Nachweis mit anderen Micro- bzw. Macro-Array-Systemen laufen diese beiden Prozesse meist isoliert voneinander ab. Im AP[®]-Nachweissystem müssen jedoch die Reaktionsbedingungen so abgestimmt werden, dass beide in der Kartusche nacheinander stattfindenden Prozesse optimal ablaufen.

Die Kombination birgt den Vorteil eines unterbrechungsfreien Ablaufs, sie ist zeitsparend und verhindert zudem Kontaminationen, welche beim Umpipettieren zwischen PCR- und Hybridisierungsreaktion auftreten können.

5.2.4.1 Einfluss der Salzkonzentration auf die Hybridisierung

Bevor die Effizienz der Hybridisierung untersucht wurde, musste sichergestellt werden, dass in der AP[®]-Kartusche eine zum Labor-PCR-Gerät vergleichbare Produktmenge bei der Amplifikation in der PCR gebildet wird. Dafür wurde der E1-Genabschnitt von VEEV in einem Ansatz auf dem Opticon-PCR-Gerät amplifiziert, ein zweiter PCR-Ansatz erfolgte in der AP[®]-

Kartusche ohne nachfolgende Denaturierung und Hybridisierung. Im Anschluss wurden je 20 µl des entstandenen Amplikons hinsichtlich der gebildeten Menge in einem Agarosegel ausgewertet. Es zeigte sich, dass die Mengen des 131 bp langen amplifizierten Produktes zwischen dem PCR-Gerät und der Kartusche vergleichbar waren (Abbildung 23). Dieses Ergebnis wird durch die Untersuchung gestützt, dass ein extern amplifiziertes Fluoreszenzmarkiertes PCR-Produkt nach der Hybridisierung in der AP[®]-Kartusche gleichwertige Signalintensitäten hervorbringt wie ein in der Kartusche gebildetes Amplikon (Daten nicht gezeigt).

In den nachfolgenden Experimenten galt es daher, die Hybridisierung an die immobilisierten Fängersonden zu untersuchen.

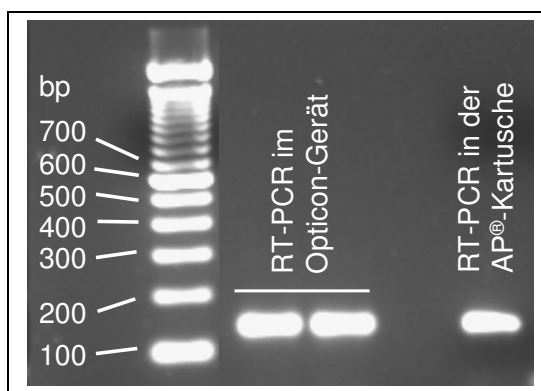


Abbildung 23: Vergleich der gebildeten Amplikonmengen im Laborgerät und in der AP[®]-Kartusche

Von dem 131 bp langen VEEV_E1-Amplikon wurde in der AP[®]-Kartusche des Biochip-Systems eine mit dem Laborgerät Opticon vergleichbare Produktmenge während der RT-PCR gebildet.

Die Stringenz einer Hybridisierung definiert den Prozentsatz an homologen und nicht-homologen Bindungen von PCR-Amplikon und Hybridisierungssonde. Die Stringenz wird beeinflusst durch die Zusammensetzung der DNA-Sequenzen wie ihr GC-Gehalt, die Länge und Art des PCR-Produktes, die Größe der Identitätssequenz zwischen PCR-Produkt und immobilisierter Sonde, die Markierung, Temperatur und Zusammensetzung der Hybridisierungslösung [206,207].

Monovalente Kationen wie z.B. Na⁺ und K⁺ erhöhen die Stabilität und den Schmelzpunkt der DNA durch die Schwächung der intermolekularen Abstoßung der negativ geladenen Einzelstränge. Divalente Kationen (z.B. Mg²⁺) stabilisieren den Doppelstrang. Durch die Erhöhung dieser Ionen im Hybridisierungspuffer wird die Bindung der Einzelstränge an die Hybridisierungssonden beschleunigt. Durch die Zugabe organischer Lösungsmittel wie Formamid kann die Hybridisierungstemperatur erniedrigt werden, somit kann thermisch bedingten Strangbrüchen bei hohen Temperaturen vorgebeugt werden. Anionische Makromoleküle wie Dextran sollen den unspezifischen Hintergrund reduzieren [206,207].

Insbesondere die Zugabe der monovalenten Kationen (in einer Konzentration zwischen 0,4 bis 1,5 M) erhöht das Hybridisierungssignal um ein Vielfaches [206,207]. In bereits zuvor durchgeführten Experimenten konnte im biologischen Zentrallabor des WIS gezeigt werden,

dass die Zugabe von 5 x SSC-Puffer in den PCR- bzw. RT-PCR-Ansatz zu einer Hemmung der Amplifikationsrate während der PCR bzw. RT-PCR führt. Dabei zeigte sich, dass die PCR-Reaktion weniger sensitiv auf diese Zugabe reagierte als die RT-PCR und dass die RT-Enzyme durch eine erhöhte Salzkonzentration im Reaktionsansatz vollständig gehemmt wurden (HÜLSEWEH, B. (2008), persönliche Mitteilung). Dies führt dazu, dass keine DNA für die anschließende PCR gebildet und somit kein Signal detektiert werden konnte. Im Rahmen der nachfolgend aufgeführten Experimente sollten die optimalen Reaktionsbedingungen für die beiden nacheinander kombinierten Prozesse gefunden werden.

Zur Untersuchung, welchen Einfluss die Zugabe von 5 x SSC (entspricht 0,9 M Na⁺) als Endkonzentration auf die Signalintensität in der AP[®]-Kartusche hat, wurde dessen Auswirkung bei einer von der RT-PCR isolierten Hybridisierung überprüft. Im real-time-PCR-Gerät (Opticon) wurde eine RT-PCR für das E1-Gen von VEEV durchgeführt. Das dabei entstandene Cy5-Amplikon wurde in eine Kartusche ohne SSC und in eine zweite Kartusche mit 5 x SSC Endkonzentration gegeben. Ergebnis war, dass die Zugabe von SSC-Puffer zu einer Signalerhöhung von 65 % bei den spezifischen VEEV-Sonden und um fast 300 % bei der Consensus-Sequenz führte (Abbildung 24). Die Zugabe von 5 x SSC-Puffer in den RT-PCR-Ansatz bewirkt jedoch eine vollständige Hemmung der RT-Reaktion (HÜLSEWEH, B. (2008), persönliche Mitteilung). Eine Injektion von SSC-Puffer in Anschluss an die PCR könnte somit eine Signalerhöhung durch die Verbesserung der Hybridisierungsbedingungen hervorrufen. Dies könnte firmenseits durch eine bauliche Veränderung in der Kartusche bewerkstelligt werden, z.B. mit einem Dorn, welcher nach der PCR mechanisch durch die Silikondichtung den SSC-Puffer in die Reaktionskammer injiziert.

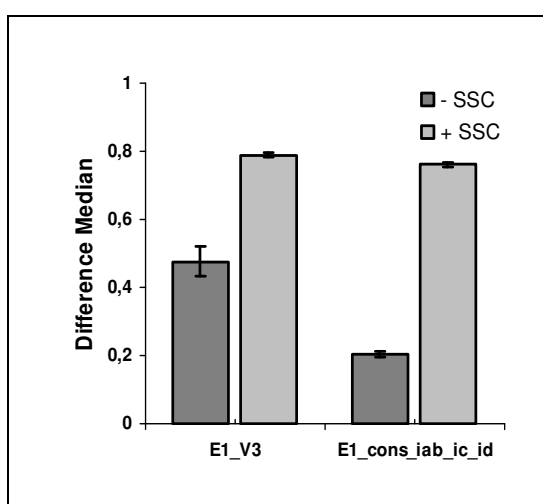


Abbildung 24: Hybridisierung in der AP[®]-Kartusche mit und ohne 5 x SSC-Puffer

Dargestellt sind die Hybridisierungssignale der spezifischen TC-83-Sonde und der VEEV-Consensus-Sonde nach der Bindung eines extern hergestellten VEEV_E1-Amlikons ohne und mit Zugabe von 5 x SSC-Puffer. Die Zugabe von SSC-Puffer führte insbesondere bei der Consensus-Sonde zu einem starken Signalanstieg.

Alternativ zu SSC-Puffer wurde zudem der Zusatz von Kaliumacetat (KAc) getestet. Bei der Titration von KAc in 15 mM-Schritten von 0 mM bis 45 mM konnte bei einer Konzentration von 15 mM nur eine geringe Signalreduktion im VEEV_E1-Nachweis in der AP[®]-Kartusche detektiert werden, bei einer Erhöhung der KAc-Konzentration darüber hinaus sank die Signalintensität aber fast bis zur Detektionsgrenze. Auch eine Erhöhung der RT-PCR-Pufferkonzentration auf 1,5 x erbrachte keine positive Signalverstärkung nach Auslesung des Chips (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund dieser experimentellen Daten wurde nachfolgend die RT-PCR mit anschließender Hybridisierung in der AP[®]-Kartusche ohne weiteren Zusatz von Salzen durchgeführt.

5.2.4.2 Einfluss der Enzymkonzentration auf die Produktausbeute in der RT-PCR

Um die Amplifikation und die damit verbundene Produktmenge zu erhöhen, wurde untersucht, inwieweit eine erhöhte Menge an Reverser Transkriptase und/oder DNA-Polymerase eine Verbesserung der Signalintensität zur Folge hat. Als optimale Menge ergab sich 1 µl pro 50 µl Ansatz des OneStep-RT-Enzym-Mixes (Qiagen), welcher die RT-Enzyme Omniscript und Sensiscript Reverse Transkriptase und die HotStarTaq-DNA-Polymerase enthält. Eine Erhöhung darüber hinaus resultierte in einer Hemmung der gesamten Reaktion mit einem Signalverlust von 75 bis 90 % (Daten nicht gezeigt). Diese ist möglicherweise auf den erhöhten Glycerin-Gehalt im Enzym-Mix zurückzuführen.

5.2.4.3 Einfluss der Primerkonzentrationen auf die Signalintensität

Bei der Hybridisierung wird nur der Cy5-markierte DNA-Einzelstrang des amplifizierten Amplikons an der Sonde nachgewiesen. Daher wurde analysiert, ob mittels asymmetrischer PCR durch den vermehrten Einsatz des reverse Primers die Bildung des Fluoreszenz-markierten Stranges forciert und somit die Signalintensität erhöht werden kann. Der reverse Primer wurde stufenweise von 200 nM auf bis zu 800 nM im Reaktionsansatz erhöht, während die Menge des forward Primers beibehalten (200 nM) bzw. sukzessive in seiner Konzentration auf 50 nM reduziert wurde.

Die doppelte Menge des reverse Primers bei gleich bleibender forward Primermenge führte zu einer 4-fach erhöhten Signalintensität (Abbildung 25). Die Reduktion des forward Primers unter die bisher genutzte Konzentration von 200 nM führte in allen getesteten Nachweisen zu einer Reduktion des Signals. Bei einer weiteren Modifikation des Verhältnisses der Primerkonzentration von forward zu reverse Primer auf bis zu 1:4 (forward 200nM – reverse 800 nM) konnte keine weitere Verbesserung des Detektionssignals ermittelt werden.

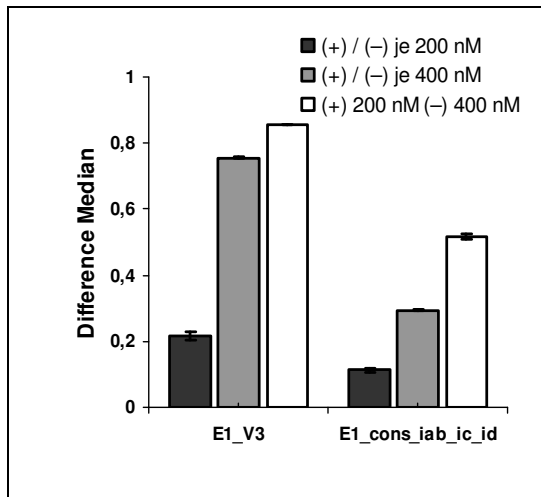


Abbildung 25: Einfluss der Erhöhung der Primerkonzentration auf die Signalintensität

Dargestellt sind die Hybridisierungssignale der spezifischen TC-83- und der VEEV-Consensus-Sonde nach der VEEV_E1-RT-PCR und Hybridisierung in der AP[®]-Kartusche. Durch die Verdopplung der Primerkonzentration von 200 auf 400 nM ergab sich eine Erhöhung der E1_V3-Signalintensität um das ca. 3,5-fache. Diese konnte durch die einseitige Erhöhung des reverse Primers (-) von 200 auf 400 nM bei Beibehaltung der forward Primermenge (+) bei 200 nM weiter erhöht werden. Bei der Consensus-Sonde konnte dabei eine Signalsteigerung von über 400 % im Vergleich zum Standardansatz gemessen werden.

5.2.4.4 Einfluss der Extensionstemperatur in der PCR auf die Intensität der Hybridisierungssignale

Die optimale Extensionstemperatur für die HotStarTaq-DNA-Polymerase wird vom Hersteller Qiagen mit 72°C angegeben. Es handelt es sich dabei um eine rekombinante Polymerase, isoliert aus *Thermus aquaticus*, welche in *E.coli* produziert wird. Die Extensionsrate beträgt laut Hersteller 2 – 4 kb pro Minute.

Für den standardmäßigen real-time Virusnachweis mit TaqMan-Sonde wird im Zentrallabor jedoch eine Standardextensionstemperatur von 60°C eingesetzt. Die Extensionstemperatur von 60°C liefert in der real-time PCR bzw. RT-PCR im Vergleich zu einer Temperatur von 72°C auf dem Opticon-Cycler eine ca. fünf- bis zehnfach höhere Fluoreszenzausbeute bei gleicher Amplikonmenge (HÜLSEWEH, B. (2007), persönliche Mitteilung).

Zur Überprüfung, ob bei der RT-PCR in der AP[®]-Kartusche bei den für die Taq-Polymerase angegebenen 72°C eine höhere Produktmenge und somit Signalintensität zu erzielen ist, wurden die Virusnachweise mit einer Extensionstemperatur von 60°C und 72°C für 35 s über 45 Zyklen durchgeführt. Alle übrigen Reaktionsparameter blieben unverändert.

Bei den meisten viralen Nachweisen ergab sich bei der Temperatur-Erhöhung keine Steigerung der Signalintensität, in einigen Fällen sogar eine Verschlechterung der Signale um bis zu 60 %. In Abbildung 26 sind exemplarisch die Signalintensitäten des EEEV-Nachweises im E1- und E2-Gen bei einer PCR-Amplifikation bei 60°C bzw. 72°C dargestellt.

Für die Identifikation von EEEV im E1-Gen ergab sich eine Reduktion der Signale um bis zu 15 % (Abbildung 26a), im E2-Gen konnte sogar ein Rückgang der Signale um bis zu 35% gemessen werden (Abbildung 26b). Die Ursache für diesen Unterschied zwischen der Detektion im E1- und im E2-Gen könnte sein, dass sich die Signale des EEEV_E1-Nachweises im Vergleich zum EEEV_E2-Nachweis bereits in der optischen Sättigung befinden und somit eine

Veränderung der Signalintensitäten weniger ins Gewicht fallen, als bei Nachweis-Reaktionen, welche noch nicht das Signal-Maximum erreicht haben (siehe 5.2.4.11 und 5.2.4.5.3).

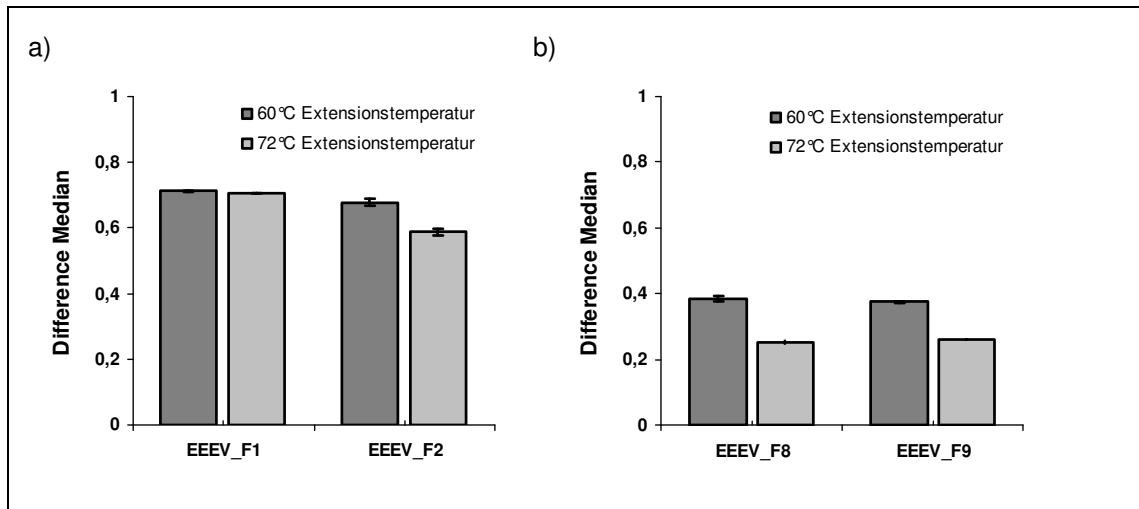


Abbildung 26: Einfluss der Extensionstemperatur auf die Signalintensität

Dargestellt sind die Signale des EEEV-Nachweises im E1- (a) bzw. E2-Gen (b) nach einer PCR-Amplifikation mit einer Extensionstemperatur von 60 bzw. 72 °C. Die Amplifikation bei 72°C führte zu keiner Signalerhöhung, sondern resultierte entweder in gleich bleibenden Signalintensitäten (EEEEV_F1 in (a)) oder in einer Reduktion der spezifischen Signale (EEEEV_F2 in (a) bzw. EEEV_F8 und EEEV_F9 in (b)).

Die Extension im PCR-Zyklus wurde aufgrund der erhaltenen Daten nachfolgend ausschließlich bei 60°C durchgeführt. Dies gewährleistet somit zudem eine verbesserte Vergleichbarkeit der PCR-Nachweise in der AP[®]-Kartusche mit zuvor auf dem real-time-PCR-Gerät optimierten Nachweisen.

5.2.4.5 Einfluss der Prozessierungszeit in der RT-PCR und in der Hybridisierung auf die Signalintensität

Um die Identifikation eines B-Agens in möglichst kurzer Zeit zu realisieren, ist eine Optimierung der Prozessierungszeit bei möglichst gleich bleibender Signalstärke nötig. Die vier Stellschrauben, welche zur Verkürzung der Prozessierungszeit im AP[®]-System in Frage kommen, sind die Extensionszeit, die PCR-Zyklusanzahl, die Länge des Denaturierungsschrittes vor der Hybridisierung und die Hybridisierungszeit im Anschluss an die PCR. In nachfolgenden Experimenten wurde analysiert, welche Schritte der RT-PCR zeitlich reduziert werden können, ohne dass es zu Einbußen bei der Signalintensität kommt.

5.2.4.5.1 Extensionszeit

Die Prozessivität der HotStarTaq-Polymerase wird von der Herstellerfirma Qiagen mit 2 bis 4 kb/min angegeben. Mit einer maximalen Länge der PCR-Produkte von 182 bp (VEEV_E2-Amplikon) ist somit theoretisch eine vollständige Amplifikation der spezifischen Genabschnitte in ca. 5 bis 10 s zu erwarten. Es wurde daher für den VEEV_E1-Nachweis getestet, wie sich eine stufenweise Verkürzung der Extensionszeit von 35 s auf 20 s in 5 s-Schritten auf die Intensität der Hybridisierungssignale auswirkt.

Entgegen den Erwartungen führte die Reduktion der Extensionszeit von 35 s bis auf 20 s zu einer Verringerung des Signals um ca. 50 % bei der spezifischen VEEV TC-83-Sonde bzw. 80 % bei der VEEV-Consensus-Sonde bei der Amplifikation des 131 bp langen VEEV_E1-Amplikons (Daten nicht gezeigt). Eine Extensionszeit von 30 bis 35 s ist somit für die vollständige Amplifikation der viralen Gen-Abschnitte in der AP[®]-Kartusche unabdingbar. Bei diesem Schritt besteht hinsichtlich des Gesamtzeitbedarfs somit nur ein geringes Einsparpotential.

5.2.4.5.2 Zykluszahl

Die Amplifikation mittels PCR wird in der Regel mit einer Zykluszahl durchgeführt, welche gewährleistet, dass die maximale Menge des Amplikons gebildet wird. Voraussetzung dafür ist, dass Primer, dNTPs und Enzym im Überschuss vorliegen.

Durch die Bildung des PCR-Produktes kommt es jedoch im Normalfall zu einer Produkthemmung, d.h. es wird, obwohl noch ausreichend Reaktionskomponenten zur Synthese vorhanden sind, kein weiteres PCR-Produkt mehr gebildet. Das Maximum der Produkte wird je nach Einsatz der Template-Menge im fg-, pg- oder ng-Bereich bereits nach 15 bis 30 Zyklen erreicht. Um zu untersuchen, wann diese Produkthemmung beim VEEV_E1-Nachweis in der Kartusche einsetzt und welche maximalen Zykluszahlen für den VEEV-Nachweis ausreichend sind, wurde diese in 5er-Schritten reduziert. Dabei stellte sich heraus, dass die Zykluszahl ohne

nennenswerte Signaleinbußen von 45 auf 35 Zyklen reduziert werden kann (Daten nicht gezeigt). Dies erbringt für den Gesamtnachweis ein Einsparpotential von 9 Minuten.

5.2.4.5.3 Denaturierungszeit vor der Hybridisierung

Vor der Hybridisierung des Amplikons mit seiner spezifischen Sonde an der Chipoberfläche muss der DNA-Doppelstrang aufgeschmolzen werden. Nur nach diesem Schritt liegt der Fluoreszenz-markierte Strang als Einzelstrang vor und kann mit den komplementären Basen der immobilisierten Sonde hybridisieren. Standardmäßig wurde für die Experimente eine Aufschmelzzeit von 2 Minuten gewählt.

Theoretisch besteht bei der Hybridisierung in der AP[®]-Kartusche eine Konkurrenzsituation, da der Fluoreszenz-markierte Einzelstrang sowohl an seinen komplementären Einzelstrang als auch an die spezifische Hybridisierungssonde binden kann. Ist der Cy5-markierte Einzelstrang des PCR-Amplikons noch nicht vollständig von seinem komplementären Strang im Denaturierungsschritt getrennt worden, ist die Reassoziationswahrscheinlichkeit an diesen während der Hybridisierungsphase wahrscheinlicher als an die weiter entfernt liegende Sonde auf der Chipoberfläche.

Um ein vollständiges Aufschmelzen der Doppelhelix zu gewährleisten und somit eine leichtere Reassoziierung der Einzelstränge zu verhindern, wurde der Denaturierungsschritt schrittweise auf 16 Minuten erhöht, um zu untersuchen, welche Zeitspanne für ein optimales Hybridisierungsergebnis notwendig ist.

Bei der Verlängerung der Denaturierungszeit auf bis zu 16 Minuten konnte jedoch keine signifikante Steigerung der Signalintensität detektiert werden, was zu dem Schluss führte, dass 2 Minuten für die vollständige Denaturierung des DNA-Doppelstranges ausreichen (Daten nicht gezeigt).

5.2.4.5.4 Hybridisierungszeit

Zur möglichen weiteren Zeitersparnis wurde überprüft, ob eine Reduzierung der Hybridisierungszeit von 30 Minuten um 5-Minuten-Schritte in einer gleich bleibenden Signalintensität resultiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der Hybridisierungszeit von 30 auf 20 Minuten bei vergleichbaren spezifischen Signalen möglich ist. Die weitere Reduzierung der Hybridisierungszeit zeigte einen größeren Einfluss auf die Signalintensität der Consensus-Sonde als auf die Signalintensität der stammspezifischen VEEV-Sonden. Die stammspezifische VEEV-Sonde zeigte auch nach 10 Minuten Hybridisierung vergleichbare Signalthöhen, wohingegen bei der Consensus-Sequenz eine Signalreduktion um 45 % im Vergleich zur 30-minütigen Hybridisierung zu messen war (Abbildung 27).

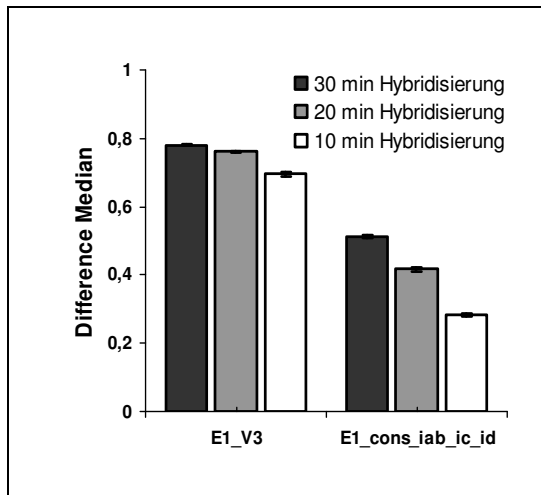


Abbildung 27: Einfluss der Hybridisierungszeit auf die Signalintensität

Dargestellt sind die Hybridisierungssignale der spezifischen TC-83- und der VEEV-Consensus-Sonde nach der VEEV_E1-RT-PCR und Hybridisierung in der AP®-Kartusche. Die Reduktion der Hybridisierungszeit um 20 Minuten von 30 auf 10 Minuten resultierte bei E1_V3 lediglich in einer Reduktion der Signalintensität um 10 %, währenddessen fielen die Signale der Consensus-Sonde um fast die Hälfte.

Der Unterschied im Rückgang der Signalintensität beider Sonden kann damit erklärt werden, dass sich die Signale der TC-83-spezifische Sonde im Maximum befinden, das heißt, dass die Signale bei 30 und 20 Minuten Hybridisierung nur bis zu einem Schwellenwert von ca. 0,8 abgebildet werden, was der optischen Sättigung des Gerätes entspricht. Signale, welche eine Intensität über 0,8 aufweisen, werden in diesem Bereich nicht mehr mit ihrer effektiven Signalhöhe dargestellt (siehe auch Abschnitt 5.2.4.11). Eine Reduktion der Signale bei E1_V3 bei der Verminderung der Hybridisierungszeit wird somit erst erfasst, wenn diese den Bereich der optischen Sättigung (ca. 0,8) unterschreiten.

5.2.4.6 Kombination der vier Schritte zur Zeitersparnis

In einem abschließenden Experiment zur Zeitersparnis bei der Prozessierung in der AP®-Kartusche wurde ein Vergleich des Standard-RT-PCR-Protokolls mit dem zeitlich optimierten RT-PCR-Protokoll durchgeführt. Jeder einzelne veränderte Parameter (Extensionszeit, Zyklusanzahl und Hybridisierungszeit) zog eine geringfügige Reduktion der Signalintensität nach sich, daher sollte untersucht werden, ob eine Kombination dieser drei Parameter zu einem aufsummierten Rückgang des Signals führt oder ob dieses vollständig einbricht. Die Zeitersparnis durch das optimierte Protokoll betrug durch die Verminderung der Extensionszeit von 35 s auf 30 s und der Hybridisierung von 30 min auf 10 min sowie der Reduktion der PCR-Zyklen von 45 auf 35 Zyklen 34 Minuten im Vergleich zur Standard-Prozessierungszeit von 128 Minuten.

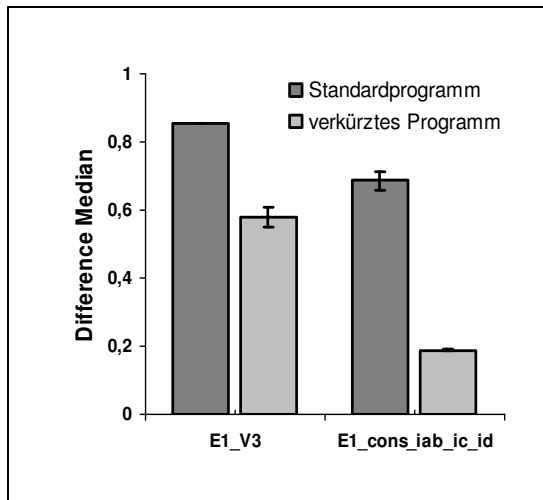


Abbildung 28: Vergleich des Standard-RT-PCR-Protokolls mit dem verkürzten Prozessierungsprotokoll

Dargestellt sind die Hybridisierungssignale der spezifischen TC-83 und der VEEV-Consensus-Sonde. Es wurden die Signale der Standard-RT-PCR- und Hybridisierungsreaktion mit denen des verkürzten Prozessierungsprotokolls verglichen. Der Signalrückgang – bedingt durch die Zeiteinsparung bei Extensionszeit, Zyklusanzahl und Hybridisierungszeit – betrug bei der stammspezifischen Sonde E1_V3 ca. 20 % und bei der Consensus-Sonde fast 70 %.

Bei der stammspezifischen VEEV-Sonde kam es durch die Zeitverkürzung zu einer Signalreduktion von ca. 20 %, wobei der durch die Einzelexperimente zu erwartende Rückgang bei 15 % lag (aufsummierte Signalrückgänge bei den Einzelexperimenten zu Extensionszeit, Zyklusanzahl und Hybridisierungszeit). Im Gegensatz dazu fielen die Signalintensitäten der VEEV-Consensus-Sequenz deutlich um fast 70 % des Ausgangswertes, was der zu erwartenden Reduktion anhand der durchgeführten Einzelexperimente zur Zeitoptimierung entsprach (Abbildung 28). Die Hybridisierungszeit von 10 Minuten stellte bei beiden VEEV-Sonden den Hauptfaktor für die Signalreduktion dar. Sollte das zeitoptimierte Prozessierungsprotokoll in Zukunft genutzt werden, wäre eine Reduktion der Hybridisierungszeit von 30 auf 20 Minuten vorteilhafter, dies würde immer noch zu einer Gesamtzeiterparnis von 24 Minuten (ca. 18 % der Standard-Prozessierungszeit) führen. Für die weiteren Optimierungsexperimente wurde weiterhin das Standard-RT-PCR-Protokoll genutzt, um eine Vergleichbarkeit mit bisher getätigten Experimenten zu gewährleisten.

5.2.4.7 Optimierung der auf dem Biochip immobilisierten Hybridisierungssonden

Anhand der ersten mit dem WIS-Chip 17 und 18 AP[®] durchgeführten Experimente konnten die spezifischen Signalintensitäten der immobilisierten Oligonukleotidsonden abgeschätzt und bewertet werden. Fängersonden, welche bei einem spezifischen Virusnachweis keine ausreichend hohen Signale (Difference Median: $< 0,1$) erbrachten, wurden beim Spotten der nächsten Chip-Chargen nicht mehr berücksichtigt und durch neu konzipierte Fänger-Oligonukleotide ersetzt. Für virale Nachweise, welche in einer mittleren Signalintensität (Difference Median: ca. 0,4) resultierten, wurden ebenfalls neue Hybridisierungssonden konzipiert, um diese hinsichtlich ihrer Signalintensität im Vergleich zu den bereits auf dem Chip vorhandenen Fängersonden zu evaluieren.

Der EEEV-Nachweis im E1-Gen resultierte in einer Signalthöhe von ca. 0,7. Daher war es nicht nötig, die guten Signale des Nachweises von EEEV im E2-Gen (Difference Median: 0,4) durch neue Sonden weiter zu verbessern – die bereits vorhandenen Fängersonden wurden von fünf (E1-Gen) bzw. vier (E2-Gen) auf je zwei Sonden reduziert.

Gleiches galt für den VEEV_E1- als auch der Orthopocken-Nachweis mit einem Signalwert von 0,7 – 0,8 – eine Optimierung der Fängersonden war somit nicht erforderlich.

Die Hybridisierungssonden der Nachweise von VEEV im E2-Gen und von WEEV in beiden Strukturgenen (E1- und E2-Gen) wurden vollständig überarbeitet, da die Signalintensitäten der anfänglich auf dem Biochip immobilisierten Sonden eine Höhe von 0,1 nicht überstiegen. Für die Nachweise der Flaviviren WNV und YFV wurden zusätzlich neue Sonden konzipiert, welche in Bezug auf ihre Signalausbeute mit den ursprünglichen auf dem Chip gespotteten Oligonukleotiden verglichen wurden.

Zuvor wurden zur Optimierung die verschiedenen EEEV-Sonden für das E1- und das E2-Gen in ihrer Bindungsposition am PCR-Amplikon zum 3'- bzw. 5'-Ende hin variiert (Abbildung 29). Dabei ergab sich beim EEEV-Nachweis im E2-Gen eine Abstufung der Signale abhängig von ihrer Bindungsposition zum 5'-Ende des PCR-Produktes. Sonden, welche mit dem entstandenen Amplikon an dessen Cy5-markiertem 5'-Ende hybridisierten, zeigten eine höhere spezifische Signalintensität als Sonden, deren Bindungsstelle in Richtung 3'-Ende des Amplikons orientiert waren. Aus Abbildung 29 können exemplarisch die Bindungspositionen der EEEV_E2-Sonden im PCR-Amplikon entnommen werden.



Abbildung 29: Das in der PCR gebildete Amplikon für den EEEV_E2-Nachweis

Für das EEEV_E2-Amplikon (blau: forward Primer; rot: reverse Primer) sind die Bindungspositionen der spezifischen Fängersonden angegeben. Aus Übersichtlichkeitsgründen wurden die Sonden EEEV_F7 und EEEV_F8 in der Abbildung in grau dargestellt. Die Bindungsstelle der Sonde F9 ist im Vergleich zu F6 weiter zum 5'-Ende des Cy5-gelabelten Amplikon-Stranges orientiert und ergab beim spezifischen EEEV_E2-Nachweis eine höhere Signalintensität.

Dabei stellt EEEV_E6 die Sonde dar, welche im Vergleich zu EEEV_F9 zum 3'-Ende des Amplikons orientiert war und die geringeren Signalintensitäten erzielte (Difference Median EEEV_F6: 0,037; Difference Median EEEV_F9: 0,37).

Ein vergleichbarer Einfluss der Fängersonden abhängig von ihrer Bindungsposition findet sich auch für den VEEV_E1-Nachweis (Abbildung 19). Die stammspezifischen VEEV TC-83-Sonde zeigte bei der VEEV-Detektion im E1-Gen stärkere Signale als die zum 3'-Ende des Amplikons positionierte Consensus-Sonde E1_cons_iab_ic_id.

Die Signalintensitäten des VEEV-Nachweises im E1-Gen lieferte nach der Optimierung der RT-PCR- und Hybridisierungsreaktion Signale von 0,7 – 0,8 (Abbildung 35a). Es wurden dennoch weitere Consensus-Sonden konzipiert, um auch Virusstämme der antigenischen Subtypen VEEV-IC und -ID spezifisch gemeinsam zu erfassen. Der Nachweis im E1-Gen von VEEV P676 (IC-Stamm) lieferte mit der IC-Subtyp-Sonde (cons_veev_ic_E1) eine mit der stammspezifischen Sonde E1_V1 (IC-Stamm) vergleichbare Signalstärke in Höhe von 0,3 bis 0,4 (Abbildung 30a). Der Nachweis im E1-Gen von VEEV 3880 (ID-Stamm) resultierte ebenfalls in zwischen Subtyp-Sonde (cons_veev_id_E1) und stammspezifischer Sonde (E1_V2) gleichwertigen Signalen in Höhe von 0,6 bis 0,7 (Abbildung 30b).

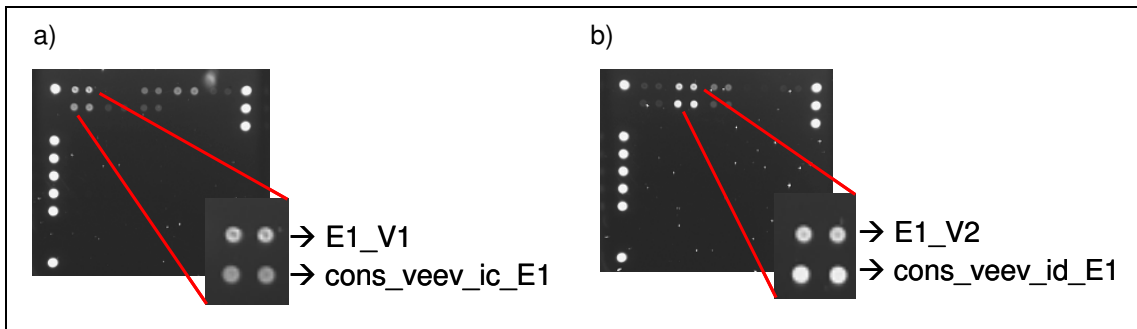


Abbildung 30: Molekularbiologischer Nachweis von VEEV Stamm V198 und 3880
 Microarray-Aufnahme des molekularen Nachweises von VEEV (a) Stamm V198 (VEEV IC-Stamm) und (b) 3880 (VEEV ID-Stamm). Die stammspezifischen Fängersonden der beiden VEEV-Stämme (E1_V1 bzw. E1_V2) ergaben nach der Hybridisierung mit den Consensus-Sonden der antigenischen Subtypen (cons_veev_ic_E1 bzw. cons_veev_id_E1) vergleichbare Signalintensitäten.

Der spezifische Nachweis des Alphavirus VEEV im E2-Strukturgen ergab in den ersten Chip-Chargen (WIS-Chip 17 und 18) keine ausreichend hohen Signalintensitäten (Daten nicht gezeigt). Dafür wurden für den WIS-Chip 21 neue Consensus-Sonden generiert, welche im Vergleich zur ersten Consensus-Sonde eine identische Länge von 26 nt und andere Bindungspositionen im Amplikon aufwiesen. Aus Abbildung 31 kann der relevante Abschnitt des Amplikons mit den Bindungsstellen der Sonden entnommen werden.

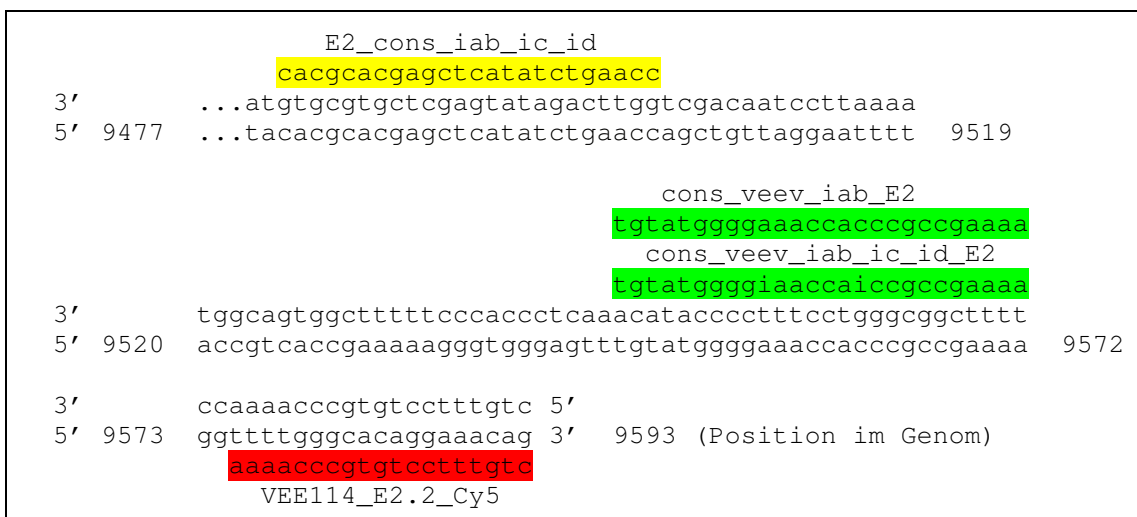





Abbildung 31: Ausschnitt des VEEV_E2-Amplikons mit den Bindungsstellen der spezifischen Consensus-Sonden
 Die erste konzipierte Consensus-Sonde E2_cons_iab_ic_id (gelb) erzeugte beim spezifischen VEEV-Nachweis im E2-Gen keine ausreichend hohen Signalintensitäten. Daher wurden zwei weitere Consensus-Sonden (grün: cons_veev_iab_E2 und cons_veev_iab_ic_id_E2) für den Nachweis verschiedener VEEV-Stämme konzipiert, deren Bindungsstellen im Vergleich zur ersten Sonde näher zum 5'-Ende des Fluoreszenz-markierten Amplikons orientiert waren. Der reverse Primer für die PCR-Amplifikation ist in rot dargestellt.

Die Sonde `cons_veev_iab_ic_id_E2` stellt eine degenerierte Sonde dar, da zwei Nukleotide, welche im Alignment aller relevanter VEEV-Stämme Abweichungen aufwiesen, durch ein Inosin ersetzt wurden, an welches theoretisch alle anderen Basen binden können. Aus Tabelle 20 kann die Gegenüberstellung der Signale der drei Fängersonden `E2_cons_iab_ic_id`, `cons_veev_iab_ic_id_E2`, `cons_veev_iab_E2` beim Nachweis von VEEV TC-83 (IAB-Stamm) im E2-Gen entnommen werden.

Tabelle 20: Vergleich der Signalintensität der VEEV_E2-spezifischen Hybridisierungs-sonden

VEEV_E2-spezifische Sonde	Abbildung und Signalwerte der Sonde	
<code>E2_cons_iab_ic_id</code>		Difference Median: 0,026
<code>cons_veev_iab_ic_id_E2</code>		Difference Median: 0,074
<code>cons_veev_iab_E2</code>		Difference Median: 0,67

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass es, wie schon vorher vermutet, einen Zusammenhang zwischen der Position der Bindungsstelle im Amplikon und der Signalhöhe gibt. Je weiter die spezifische Sonde am 5'-Ende des Fluoreszenz-gelabelten Stranges bindet, desto höher ist die resultierende Signalintensität. Dennoch konnte die degenerierte Sonde `cons_veev_iab_ic_id_E2` keine vergleichbaren Werte mit der deckungsgleichen `cons_veev_iab_E2`-Sonde erzielen. Inosin wird in der Molekularbiologie als neutrale Base eingesetzt, welche mit allen vier Basen A, T, G und C Paarungen eingehen kann. Diese Paarungen sind aber im Vergleich mit den Basenpaarungen A-T und C-T energetisch ungünstiger und nicht für alle vier Basen gleich. Die geeignetste Paarung erfolgt mit Cytosin gefolgt von Adenin. Die Paarungen mit Guanin und Thymin sind energetisch in etwa gleich und am ungünstigsten. Die in die degenerierte Sonde `cons_veev_iab_ic_id_E2` eingebauten Inosine gehen bei der Hybridisierung mit dem VEEV_E2-Amplikon eine Paarung mit einem Thymin bzw. Guanin ein. Die schwachen Signale der degenerierten Sonde von weniger als 0,1 sind daher mit diesen energetisch ungünstigen Basenpaarungen des Inosins zu erklären [208].

Ein ähnliches Bild wie beim VEEV_E2-Nachweis ergab sich für den Nachweis von WEEV im E1-Gen. Die erste konzipierte Consensus-Sonde E1_cons_weev erzeugte beim spezifischen WEEV-Nachweis im E1-Gen nur geringe Fluoreszenzsignale aufgrund ihrer Bindungsposition in Höhe des forward Primers (Abbildung 32).

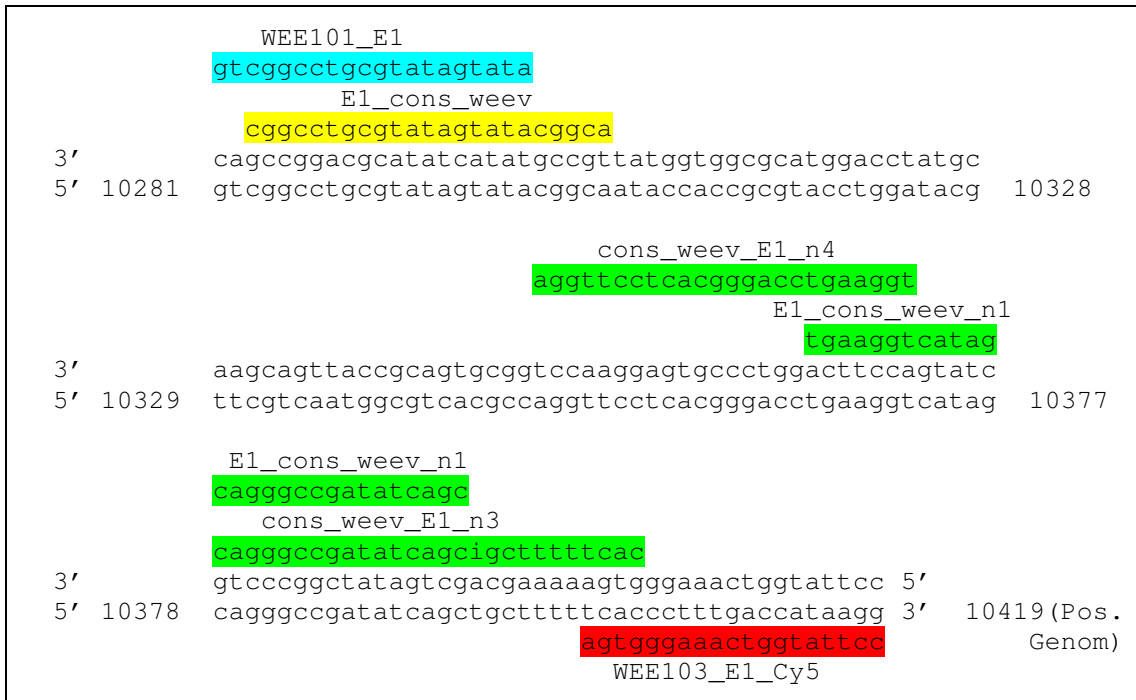






Abbildung 32: Das in der PCR gebildete Amplikon für den WEEV_E1-Nachweis mit den Bindungsstellen der spezifischen Consensus-Sonden

Es wurden drei weitere Consensus-Sonden (grün: mit den Endungen n1, n3 und n4) für den Nachweis verschiedener WEEV-Stämme konzipiert, deren Bindungsstellen im Vergleich zur ersten Sonde (gelb: E1_cons_weev) näher zum 5'-Ende des Fluoreszenz-markierten Amplikons orientiert waren. Der spezifische forward Primer ist blau und der reverse Primer rot dargestellt. Im direkten Vergleich zwischen den Sonden zeigte sich eine genaue Abstufung der Signalhöhen in Abhängigkeit von ihrer Bindungsposition innerhalb des Amplikons (Tabelle 21).

Abhängig von der Bindungsposition der neu konzipierten Fängersonden zeigte sich eine Abstufung der Signalintensitäten (Tabelle 21). Die Sonde, deren Bindungsposition am Cy5-gelabelten Amplikonstrang im Vergleich zu den anderen Sonden am nächsten zu dessen 5'-Ende orientiert war (cons_weev_E1_n3), erzielte beim spezifischen Virusnachweis die höchsten Signale (Abbildung 32 und Tabelle 21). Zusätzlich war dies mit 30 nt auch der längste immobilisierte Consensus-Fänger für den WEEV-Nachweis im E1-Gen. In die Sonde cons_weev_E1_n3 wurde aufgrund des durchgeführten Alignments ein Nukleotid durch ein Inosin ersetzt, da sich die nachzuweisenden Stämme in dieser Position in ihrer Sequenz unterscheiden. Hier zeigte sich im Vergleich zum VEEV_E2-Nachweis mit der degenerierten Sonde keine Reduktion der Signalintensität aufgrund des Einbaus von Inosin in das Oligonukleotid. Das Inosin geht bei der Hybridisierung mit dem WEEV_E1-Amplikon eine

Paarung mit einem Adenin ein, welche im Vergleich zum Thymin und Guanin bei der degenerierten VEEV_E2-Fängersonde energetisch günstiger ist und sich somit nicht signalmindernd auswirkt [208].

Tabelle 21: Vergleich der Signalintensität der WEEV_E1-spezifischen Hybridisierungssonden

WEEV_E1-spezifische Sonde	Abbildung und Signalwerte der Sonde
E1_cons_weev	 Difference Median: 0,006
cons_weev_E1_n4	 Difference Median: 0,07
E1_cons_weev_n1	 Difference Median: 0,41
cons_weev_E1_n3	 Difference Median: 0,59



Bei der Überarbeitung der Sonden für den WEEV_E2-Nachweis wurde ein weiteres Oligonukleotid auf Basis der ersten Consensus-Sonde E2_cons_weev, welche spezifische Signale in Höhe von ca. 0,25 aufwies, erarbeitet. Dafür wurde die Sonde um ein Nukleotid an ihrem 5'-Ende und um drei Nukleotide an ihrem 3'-Ende verlängert (Abbildung 33). Dies führte zu einer Signalerhöhung um 36 % im Vergleich zur Ausgangssonde (Tabelle 22).



Abbildung 33: Ausschnitt des WEEV_E2-Amplikons mit den Bindungsstellen der spezifischen Consensus-Sonden

Auf der Basis von E2_cons_weev (gelb) wurde zur Erhöhung der spezifischen Signale eine weitere um 4 nt verlängerte Hybridisierungssonde (grün: cons_weev_E2_n2) konzipiert. Der eingesetzte reverse Primer zur Amplifikation des WEEV_E2-Amplikons ist rot dargestellt.

Tabelle 22: Vergleich der Signalintensität der WEEV_E2-spezifischen Hybridisierungssonden

WEEV_E2-spezifische Sonde	Abbildung und Signalwerte der Sonde
E2_cons_weev	 Difference Median: 0,26
cons_weev_E2_n2	 Difference Median: 0,36

Bei der Konzipierung der Hybridisierungssonden auf dem Biochip für die Flavi- und Orthopockenviren konnte auf bereits in der rt RT-PCR und rt PCR generierte Daten des Biologischen Zentrallabors am WIS zurückgegriffen werden. Die dadurch entworfenen und teilweise leicht variierten Fängersonden erzielten beim spezifischen Virusnachweis zufriedenstellende Signalintensitäten (Difference Median WNV und YFV: $> 0,4$; Difference Median OPV: $0,7 - 0,8$), so dass eine weitreichende Optimierung wie bei den Alphaviren VEEV und WEEV nicht nötig war.

Zusammenfassend lässt sich aus den erzielten Daten schließen:

1. Die Orientierung der Bindungsstelle der Fängersonde zum 5'-Ende des Cy5-markierten Amplikons ist entscheidend und wichtigster Ansatzpunkt bei der Optimierung der Signalintensität. Dies lässt sich insbesondere aus den Optimierungsarbeiten der Nachweise von VEEV im E2-Gen und von WEEV im E1-Gen ableiten (siehe Abbildung 31 und Abbildung 32).
2. Der Einbau von Inosin in eine Fängersonde anstelle einer spezifischen Base resultiert in einer geringeren Signalintensität im Vergleich zu einer deckungsgleichen Sonde ohne Inosin (Nachweis VEEV_E2: Abbildung 31 und Tabelle 20). Dies liegt an der im Vergleich zur A-T- bzw. C-G-Basenpaarung energetisch ungünstigeren Bindung von Inosin an die vier möglichen Nukleinbasen.
3. Für den molekularbiologischen Nachweis mit diesem Typ Array (AP[®]-System) beträgt die optimale Sondenlänge ca. 30 Nukleotide.

5.2.4.8 Bestimmung der Nachweisgrenzen im Einzelnachweis für Alpha-, Flavi- und Orthopockenviren

Die optimierten RT-PCR- bzw. PCR-Nachweis-Reaktionen für die Alpha-, Flavi- und Orthopockenviren wurden für die Titration der Templates zur Bestimmung der Nachweisgrenzen verwendet. Um die Detektionsgrenze des Virusnachweises abschätzen zu können, wurde das RNA- bzw. DNA-Template des Reaktionsansatzes sukzessive in 10er-log-Stufen verdünnt und mittels Standard-RT-PCR-Nachweis in der AP[®]-Kartusche detektiert.

In Abbildung 34 bis Abbildung 38 sind beispielhafte Aufnahmen dieser optimierten AP[®]-Einzelnachweise für die Alphaviren EEEV, VEEV und WEEV, die Flaviviren WNV und YFV und das Orthopockenvirus VacV abgebildet. Für die Alphaviren ist sowohl der molekularbiologische Nachweis im E1- als auch im E2-Gen dargestellt. Dabei sind die einzelnen Titrations der RNA- bzw. DNA-Templates für jeweils zwei spezifische Hybridisierungssonden exemplarisch dargestellt.

Die in den Titrations erzielten Nachweisgrenzen wurden zusätzlich mit der KID_{50}/ml der Viren korreliert und auf einen 50 μl RT-PCR-Ansatz umgerechnet (siehe auch Tabelle 23). Dabei wurde davon ausgegangen, dass bei der Nukleinsäure-Aufreinigung kein Verlust entsteht und je Viruspartikel ein Virusgenom extrahiert wurde. Für die Nukleinsäure-Extraktion aus RNA-Viren wurden entsprechend der Angaben des Herstellers des Präparationskits (QIAamp Viral RNA Kit, Qiagen) 140 μl Virussuspension lysiert und die extrahierte RNA in 60 μl TE-Puffer eluiert. Bei DNA-Viren wurde mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) die DNA aus 200 μl Vaccinia-Viruspräparation extrahiert und in 200 μl TE-Puffer eluiert. Von den eluierten Virusgenomen wurden pro Nachweisreaktion 2 μl pro 50 μl Ansatz eingesetzt.

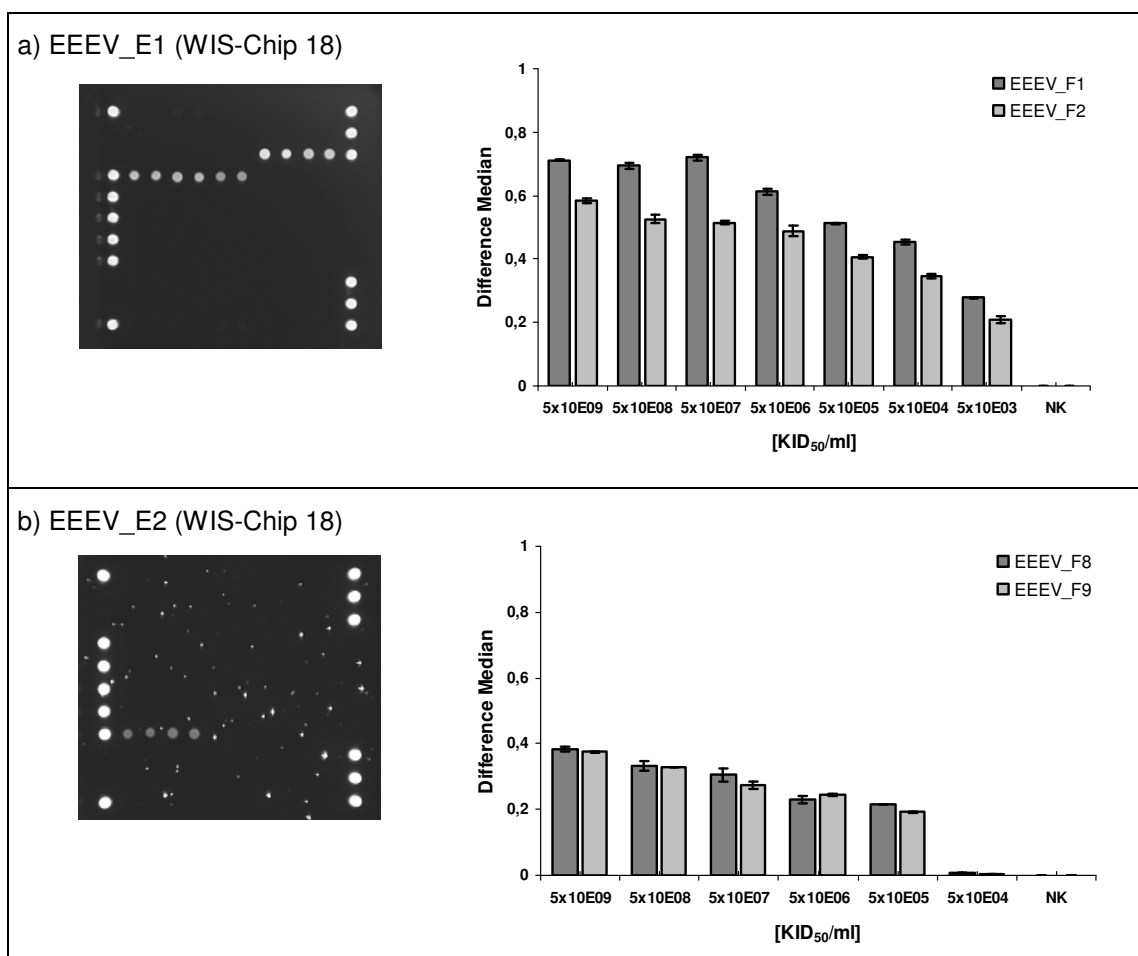


Abbildung 34: Nachweis und Titration von EEEV im E1- und E2-Gen

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des molekularbiologischen EEEV-Nachweises im E1- (a) und im E2-Gen (b). Pro 50 μl Ansatz wurden 2 μl EEEV-RNA (Stamm 178/99) in den AP[®]-Reaktionsmix gegeben und nachgewiesen. Für den EEEV-Nachweis wurde für beide Genabschnitte eine Titration des Templates in 10er-log-Stufen durchgeführt. Die Ergebnisse sind für je zwei spezifische Hybridisierungs sonden exemplarisch in einem Diagramm dargestellt.

Berechnet auf die Nachweisgrenze pro Kartusche ergab sich für den VEEV-Nachweis im E1-Gen eine Detektionsgrenze von 23 RNA Kopien (Abbildung 34a). Das Virus konnte im E2-Gen bis zu einer Anzahl an 230 bis 2 300 RNA-Kopien pro RT-PCR-Ansatz nachgewiesen werden (Abbildung 34b und Tabelle 23).

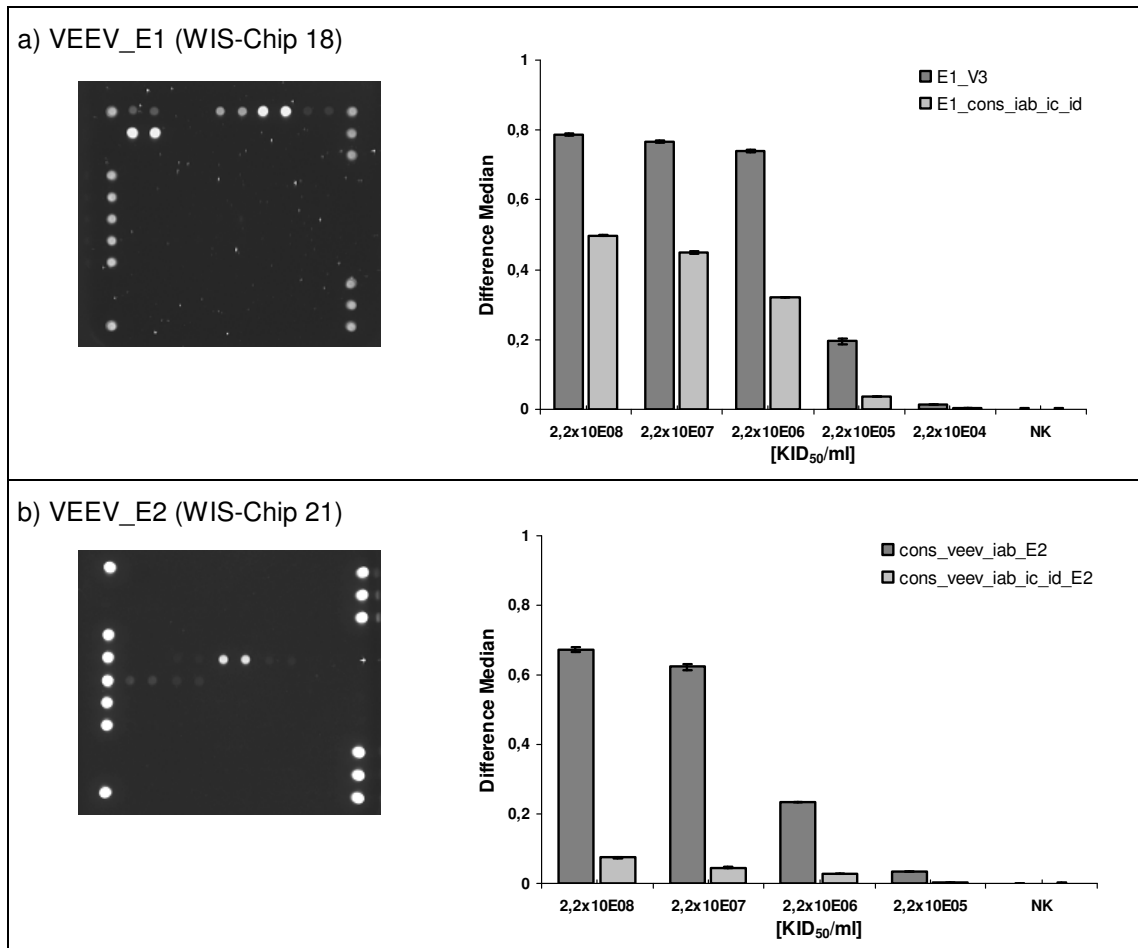


Abbildung 35: Nachweis und Titration von VEEV im E1- und E2-Gen

Die Abbildung stellt die Ergebnisse des Nukleinsäure-basierten VEEV-Nachweises im E1- (a) und im E2-Gen (b) dar. Pro 50 µl Ansatz wurden 2 µl VEEV-RNA (Stamm TC-83) in den AP[®]-Reaktionsmix gegeben und nachgewiesen. Für den VEEV-Nachweis wurde für beide Genabschnitte eine Titration des Templates in 10er-log-Stufen durchgeführt. Die Ergebnisse sind für je zwei spezifische Hybridisierungs sonden exemplarisch in einem Diagramm dargestellt.

Das Alphavirus VEEV TC-83 konnte im E1-Gen mit einer Sensitivität von 100 Genomkopien pro Ansatz (Abbildung 35a) detektiert werden. Der Nachweis von VEEV im E2-Gen konnte bis zu einer Genomkopienanzahl von 1000 pro Kartusche realisiert werden (Abbildung 35b, Tabelle 23).

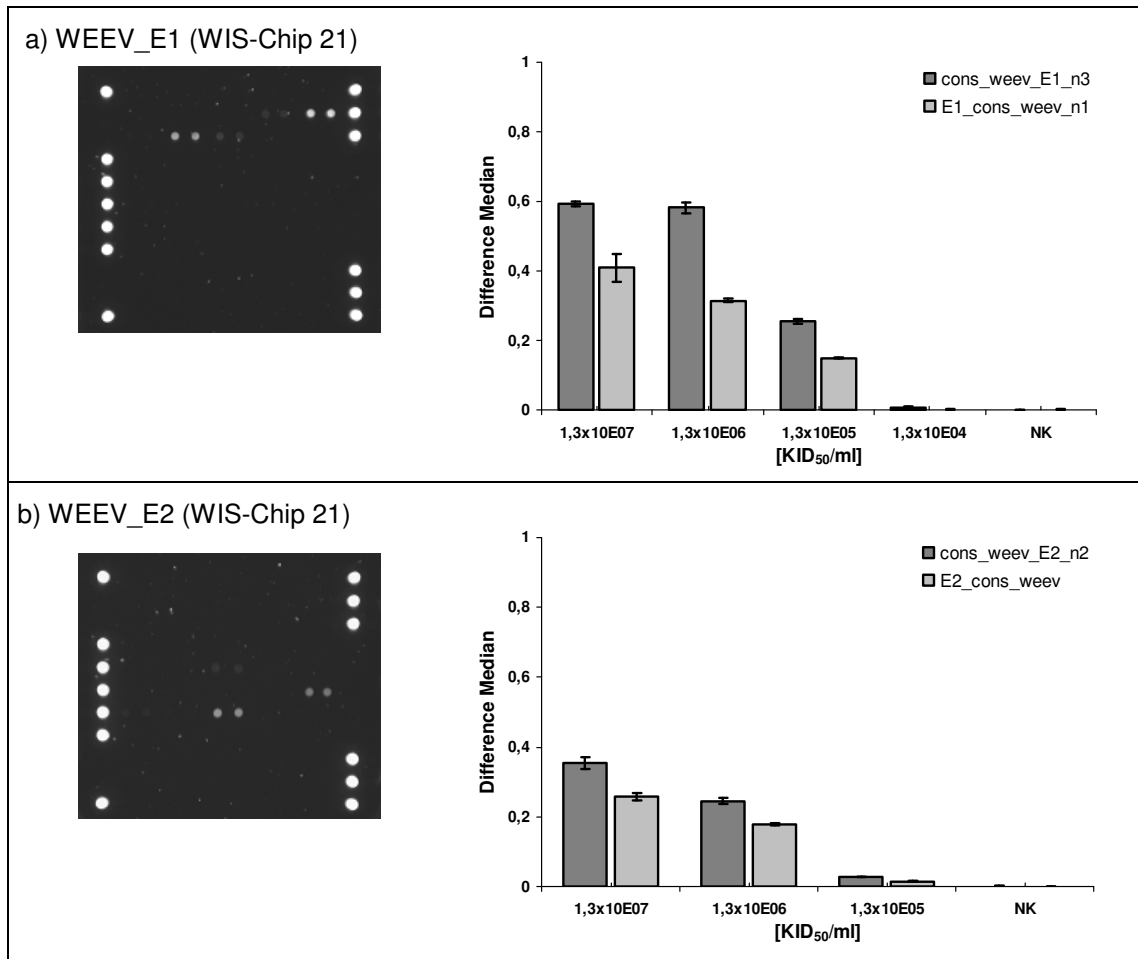


Abbildung 36: Nachweis und Titration von WEEV im E1- und E2-Gen

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des Nukleinsäure-basierten Nachweises von WEEV im E1- (a) und im E2-Gen (b). Pro 50 µl Ansatz wurden 2 µl WEEV-RNA (Stamm McMillan) in den AP®-Reaktionsmix gegeben und nachgewiesen. Für den WEEV-Nachweis wurde für beide Genabschnitte eine Titration des Templates in 10er-log-Stufen durchgeführt. Die Ergebnisse sind für je zwei spezifische Hybridisierungssonden exemplarisch in einem Diagramm dargestellt.

Die Nachweisgrenze pro RT-PCR-Ansatz für WEEV McMillan konnte im E1-Gen zwischen 60 bis 600 RNA-Kopien festgesetzt werden (Abbildung 36a). Der Nachweis im E2-Gen konnte bis zu einer Genomanzahl von 600 Kopien pro Kartusche durchgeführt werden (Abbildung 36b; Tabelle 23).

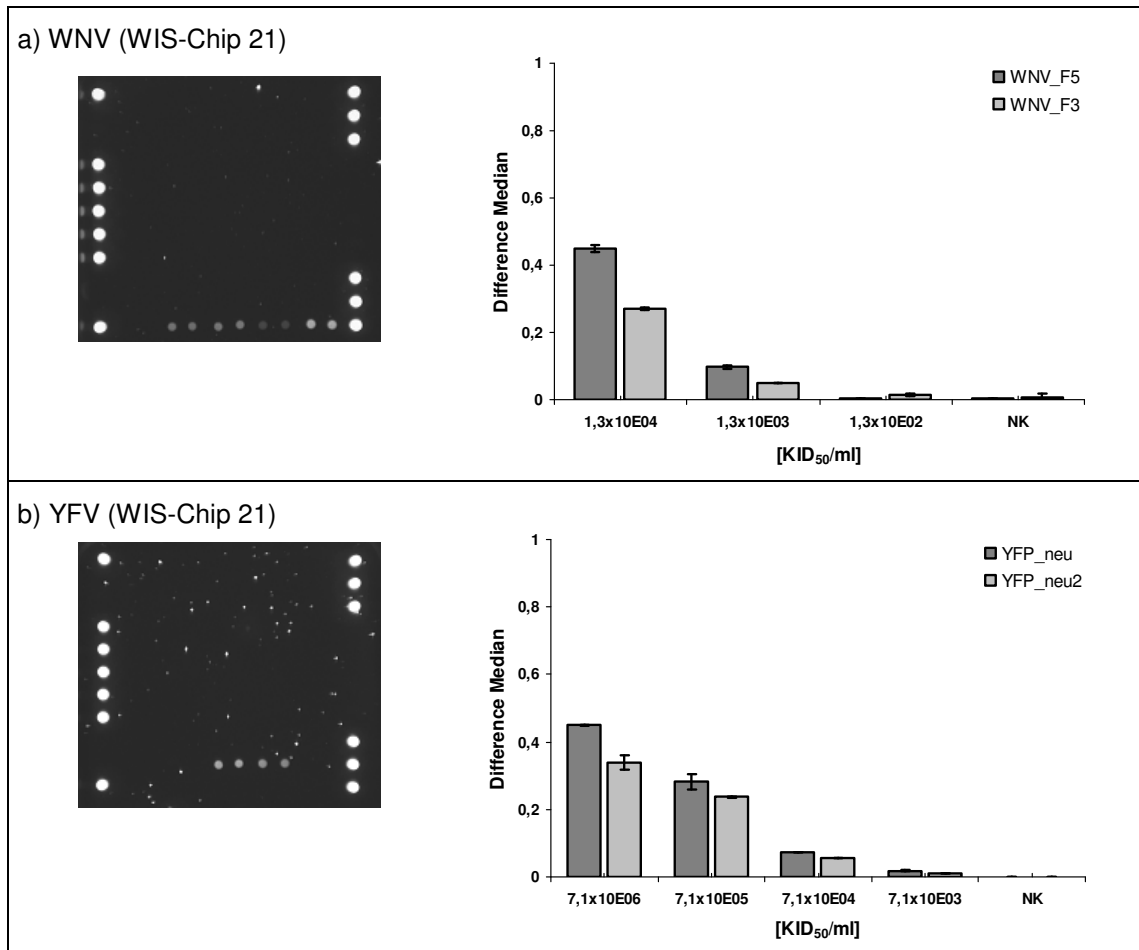


Abbildung 37: Nachweis und Titration der Flaviviren WNV und YFV

Die Abbildung stellt die Ergebnisse des molekularbiologischen Nachweises der Flaviviren WNV (a) und YFV (b) dar. Pro 50 µl Ansatz wurden je 2 µl WNV- (Stamm New York) bzw. YFV-RNA (Stamm 17D) in den AP[®]-Reaktionsmix gegeben und nachgewiesen. Für beide Flaviviren wurde eine Titration des Templates in 10er-log-Stufen durchgeführt. Die Ergebnisse sind für je zwei spezifische Hybridisierungssonden exemplarisch in einem Diagramm dargestellt.

Für das Flavivirus WNV Stamm New York ergab sich für den Nachweis in der 3'-UTR eine Detektionsgrenze zwischen 0,6 bis 6 Genomkopien pro Kartusche (Abbildung 37a). Das Gelbfieber-Virus 17D konnten im 5'-UTR-Nachweis bis zu einer Genomanzahl von 33 RNA-Kopien pro RT-PCR-Ansatz detektiert werden (Abbildung 37b; Tabelle 23).

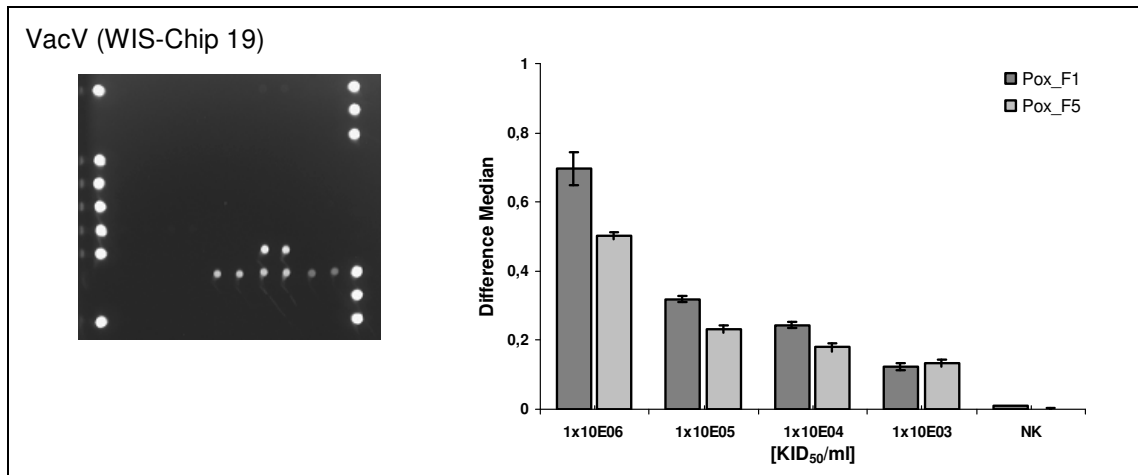


Abbildung 38: Nachweis und Titration des DNA-Virus VacV

Die Abbildung stellt die Ergebnisse des molekularbiologischen Nachweises von VacV dar. Pro 50 µl Ansatz wurden 2 µl VacV-DNA (Stamm Elstree B5) in den AP[®]-Reaktionsmix gegeben und nachgewiesen. Die Titration des Templates erfolgte in 10er-log-Stufen. Die Ergebnisse sind für zwei spezifische Hybridisierungssonden exemplarisch in einem Diagramm dargestellt.

Das DNA-Virus VacV Elstree B5 konnte im Gen des *14 kDa cell fusion protein* bis zu einer Genomanzahl von 2 DNA-Kopien pro AP[®]-Kartusche molekularbiologisch identifiziert werden (Abbildung 38; Tabelle 23).

Nachfolgend fasst Tabelle 23 noch einmal die erzielten Nachweisgrenzen aller durchgeführten Virustitrationen zusammen.

Tabelle 23: Zusammenfassung der erzielten Nachweisgrenzen der Alpha-, Flavi- und Orthopockenvirus-Nachweise im AP[®]-System

Virusnachweis (Ausgangstiter)	letzte nachzuweisende Verdünnung	Nachweisgrenze [KID ₅₀ /ml]	Nachweisgrenze pro 50 µl Ansatz
EEEV_E1 (5 x 10 ⁹ KID ₅₀ /ml)	1:1000000	5 x 10 ³	2,3 x 10 ¹ KID ₅₀
EEEV_E2 (5 x 10 ⁹ KID ₅₀ /ml)	1:10000 – 1:100000	5 x 10 ⁵ – 5 x 10 ⁴	2,3 x 10 ³ KID ₅₀ bis 2,3 x 10 ² KID ₅₀
VEEV_E1 (2,2 x 10 ⁸ KID ₅₀ /ml)	1:10000	2,2 x 10 ⁴	1 x 10 ² KID ₅₀
VEEV_E2 (2,2 x 10 ⁸ KID ₅₀ /ml)	1:1000	2,2 x 10 ⁵	1 x 10 ³ KID ₅₀
WEEV_E1 (1,3 x 10 ⁷ KID ₅₀ /ml)	1:100 – 1:1000	1,3 x 10 ⁵ – 1,3 x 10 ⁴	6 x 10 ² KID ₅₀ bis 6 x 10 ¹ KID ₅₀
WEEV_E2 (1,3 x 10 ⁷ KID ₅₀ /ml)	1:100	1,3 x 10 ⁵	6 x 10 ² KID ₅₀
WNV (1,3 x 10 ⁴ KID ₅₀ /ml)	1:10 – 1:100	1,3 x 10 ³ – 1,3 x 10 ²	6 x 10 ⁰ KID ₅₀ bis 6 x 10 ⁻¹ KID ₅₀
YFV (7,1 x 10 ⁶ KID ₅₀ /ml)	1:1000	7,1 x 10 ³	3,3 x 10 ¹ KID ₅₀
VacV (1 x 10 ⁶ KID ₅₀ /ml)	1:1000	1 x 10 ³	2 x 10 ⁰ KID ₅₀

5.2.4.9 Molekularbiologische Differenzierung von VEEV-Stämmen durch AP®-Analyse

Für die Identifikation und Gefahrenanalyse BW-relevanter Virusspezies im technischen B-Schutz ist eine Differenzierung von Virusstämmen nicht erforderlich. Der DNA-AP®-Array ermöglicht jedoch eine Unterbringung von bis zu 120 DNA-Fängersonden, die es erlauben durch eine gezielte Auswahl der Fängersonden neben der gruppenspezifischen Detektion parallel eine stammesspezifische Differenzierung von VEEV-Stämmen durchzuführen. Die Klassifizierung und Differenzierung der VEE-Viren in human- und nicht-humanpathogen bzw. Equiden-virulent und -avirulent könnte neben anderen Methoden als Anhaltspunkt für eine nachfolgende medizinische Therapie dienen.

Für die Konzeption der stammspezifischen VEEV-Fängersonden wurde wie zuvor das in Abbildung 17 dargestellte Alignment herangezogen. Zusätzlich zur Consensus-Sonde wurden für die antigenischen VEEV-Gruppen IAB, IC und ID stammspezifische Sonden auf dem Biochip immobilisiert.

In Abbildung 39 sind die Bindungspositionen der VEEV-stammspezifischen Fängersonden, welche eine Differenzierung zwischen den verschiedenen VEEV-Stämmen ermöglichen sollen, im VEEV_E1-Amplikon dargestellt.

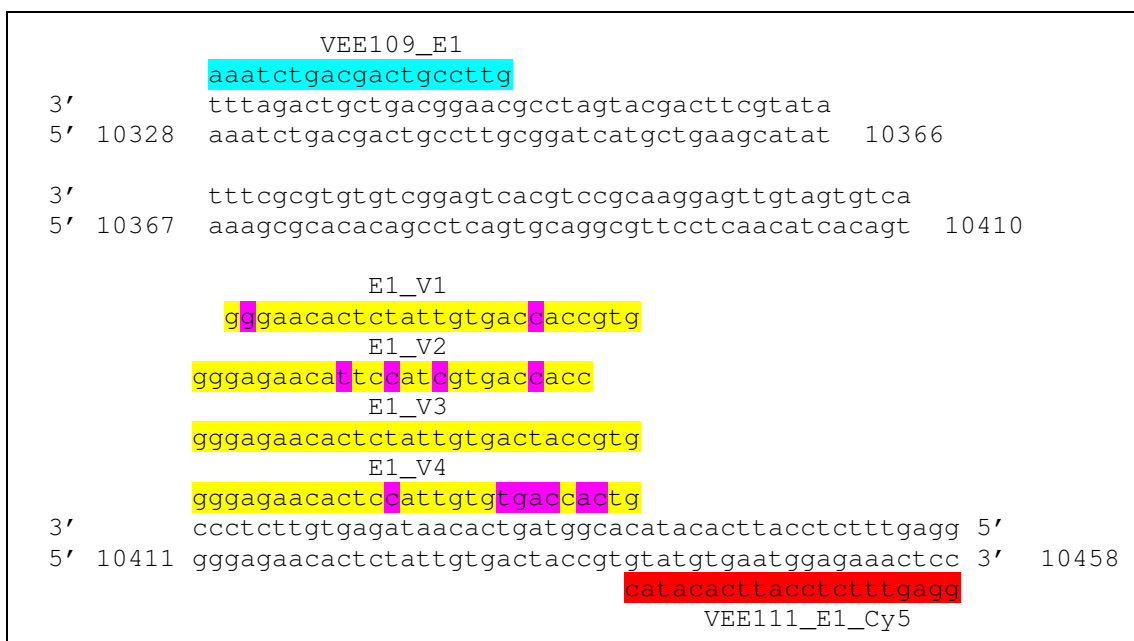


Abbildung 39: Stammspezifische VEEV-Fängersonden im VEEV_E1-Amplikon

Dargestellt ist das mit den spezifischen Primern in der RT-PCR gebildete doppelsträngige Amplikon für VEEV TC-83 im E1-Gen (blau: forward Primer; rot: reverse Primer). Zusätzlich sind die Bindungsstellen der VEEV-stammspezifischen Fängersonden E1_V1 für den IC-Stamm V198, E1_V2 für den ID-Stamm 3880, E1_V3 für die IAB-Stämme TC-83 und TrD und E1_V4 für den IC-Stamm SH3 eingezeichnet. Die Sequenzunterschiede zwischen den Fängersonden im Vergleich zur TC-83-Sonde E1_V3 sind zur Veranschaulichung pink gekennzeichnet

Es sollte getestet werden, ob eine genaue Differenzierung zwischen VEEV-Stämmen wie TC-83, TrD, P676 und 3880 anhand eines spezifischen Signalmusters möglich ist. Die VEEV-Stämme TrD und TC-83 gehören in die antigenische VEEV-Gruppe IAB (human- und equinpathogen). Der Stamm P676 ist in die ebenso humanpathogene Gruppe IC einzuordnen. Die serologische Gruppe ID beinhaltet Stämme, welche vereinzelt als humanpathogen beschrieben wurden, so z.B. VEEV 3880 [14,18,26,58,62-66].

Aus Abbildung 40 kann eine Übersicht über die Anordnung der einzelnen stammspezifischen Fängersonden auf dem Biochip in Kombination mit der Consensus-Sonde entnommen werden.

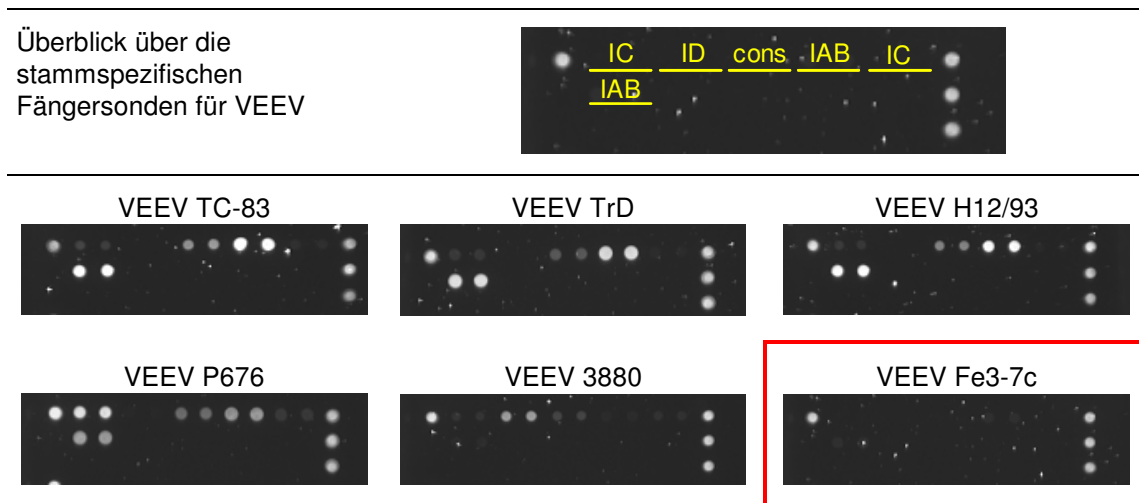


Abbildung 40: Detektion und Identifikation verschiedener VEEV-Stämme

Gezeigt sind Ausschnitte spezifischer Signale beim Nachweis verschiedener VEEV-Stämme mit dem WIS-Chip 18 AP[®]. Die dargestellten AP[®]-Fluoreszenz-Muster der Stämme TC-83, TrD und H12/93 zeigen, dass diese der serologischen VEEV-Gruppe IAB angehören. Dahingegen zeigen die Nachweise der Stämme P676 (IC) und 3880 (ID) andere Hybridisierungsmuster. Der Nachweis für den VEEV-Stamm Fe3-7c zeigt keine Signale (rot umrandet), da es sich hierbei um einen Vertreter der VEEV Gruppe II handelt.

In der AP[®]-Analyse konnten anhand des spezifischen Signalmusters Rückschlüsse auf die Zugehörigkeit der Virusspezies und Subspezies gezogen werden, zudem wurden verschiedene humanpathogene Vertreter eindeutig zugeordnet (Abbildung 40). Der bisher nicht genau definierte VEEV-Stamm H12/93 der NCPV (*National Collection of Pathogenic Viruses*, UK) konnte anhand der Hybridisierungssignale dem antigenischen Subtyp IAB zugeordnet werden. Diese Klassifizierung wurde durch eine anschließende Sequenzierung bestätigt. Der molekularbiologische Nachweis des VEEV-Stammes Fe3-7c resultierte in keinen Signalen auf dem Microarray, da dieser Stamm der serologischen Gruppe II der VEE-Viren zuzuordnen ist. Für Gruppe II Viren wurden keine Hybridisierungssonden auf dem Biochip immobilisiert, des Weiteren wurden die Primer nicht für diese antigenische Gruppe konzipiert.

5.2.4.10 Etablierung von Duplex- und Triplexnachweisen

Nach der Etablierung der viralen Einzelnachweise in der AP-Kartusche wurde getestet, ob eine parallele Detektion von zwei oder drei viralen Spezies in Kombination möglich ist. Dazu wurde zunächst exemplarisch für einen Multiplex-Ansatz zur Detektion von drei Viren die optimale Primerkonzentration bestimmt. Dabei ergab sich, dass eine Reduktion der Primermenge im Parallelnachweis zu einer Verminderung der gebildeten Produktmenge führt (Daten nicht gezeigt). Somit wurde die Primerkonzentration aus den Einzelnachweisen für die Multiplexansätze beibehalten.

Für die Parallelnachweise wurden die spezifischen Primer-Paare zusammen mit den unverdünnten RNA- bzw. DNA-Templates in den AP[®]-Reaktionsmix gegeben und in der AP[®]-Kartusche mittels RT-PCR amplifiziert. Anhand der spezifischen Hybridisierungssignale erfolgte nachfolgend die Zuordnung der Virusspezies. In Abbildung 41 bis Abbildung 46 sind verschiedene Parallelnachweise abgebildet. Alle viralen RNA- bzw. DNA-Spezies konnten parallel identifiziert werden, es ergaben sich allerdings bei verschiedenen Nachweisen Signaleinbußen im Vergleich zum Einzelnachweis.

5.2.4.10.1 Molekularbiologische Duplexnachweise im AP[®]-System

Der Parallelnachweis von EEEV im E1- und E2-Gen stellt ein Beispiel für den Nachweis eines Alphavirus in zwei verschiedenen Strukturgenen dar.

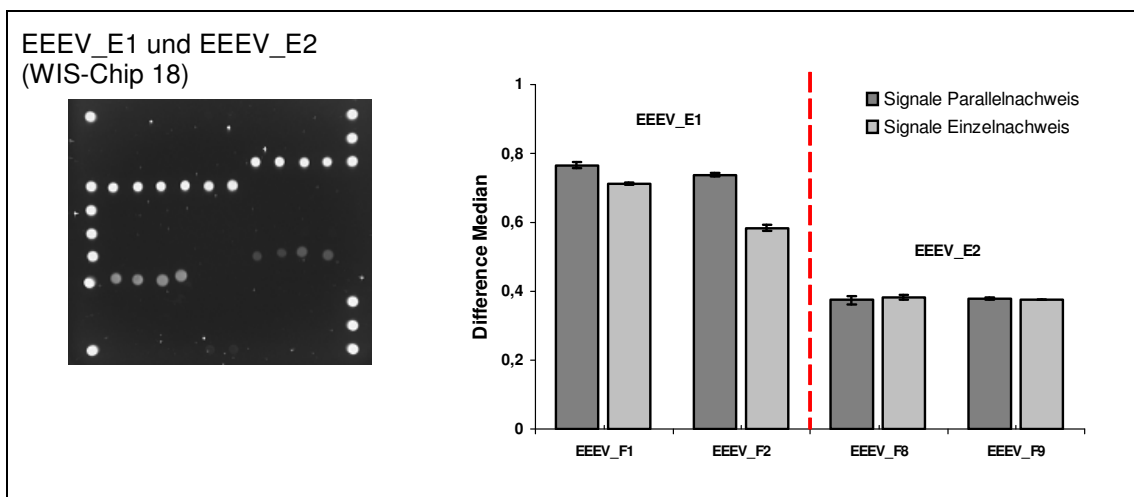


Abbildung 41: Parallelnachweis von EEEV im E1- und E2-Gen

Der Nachweis von EEEV im E1- und E2-Gen erfolgte mit den jeweils für den Einzelnachweis spezifischen forward und reverse Primern und 2 µl unverdünnter EEEV-RNA pro 50 µl Ansatz. In den Ergebnissen sind die Signalintensitäten exemplarischer Fängersonden des Duplexnachweises den Ergebnissen der spezifischen Einzelnachweise gegenübergestellt.

In diesem Nachweis wurden von EEEV $2,3 \times 10^7$ KID₅₀ im E1- und E2-Gen pro RT-PCR-Ansatz detektiert. Die Signalintensitäten von EEEV_E2 des Duplexnachweises

entsprachen denen des Einzelnachweises (siehe Abbildung 34b). Die Signale der EEEV_E1-Sonden stiegen im Vergleich zum Singleplex um bis zu 26 % (Abbildung 41 und siehe Abbildung 34a). Dieser Anstieg der EEEV_E1-Signale war auch in Kombination mit anderen Nachweisen wie VEEV_E1 sichtbar. Der Parallelnachweis entspricht somit den Werten der beiden Einzelnachweise und kann mit diesem in Bezug auf die dabei erzielte Nachweisgrenze korreliert werden.

Als Beispiel des Nachweises von zwei Alphaviren im gleichen Strukturgen wurde untersucht, ob eine parallele Identifikation von VEEV und WEEV im E1-Gen möglich ist. Es wurden von VEEV 1×10^6 KID₅₀ und von WEEV 6×10^4 KID₅₀ pro AP®-Kartusche nachgewiesen. Die benutzten Alphavirusstämme VEEV TC-83 und WEEV McMillan weisen im E1-Gen lediglich eine Gesamthomologie von 55 % auf. Die Primer für die spezifische Amplifikation von VEEV und WEEV im E1-Gen wurden zudem in einem Bereich noch geringerer Homologie (ca. 45 %) gewählt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die VEEV_E1- bzw. WEEV_E1-Hybridisierungssignale in diesem Parallelnachweis spezifisch sind und nicht durch Kreuzreaktivitäten zwischen den beiden Alphavirus-Spezies hervorgerufen wurden.

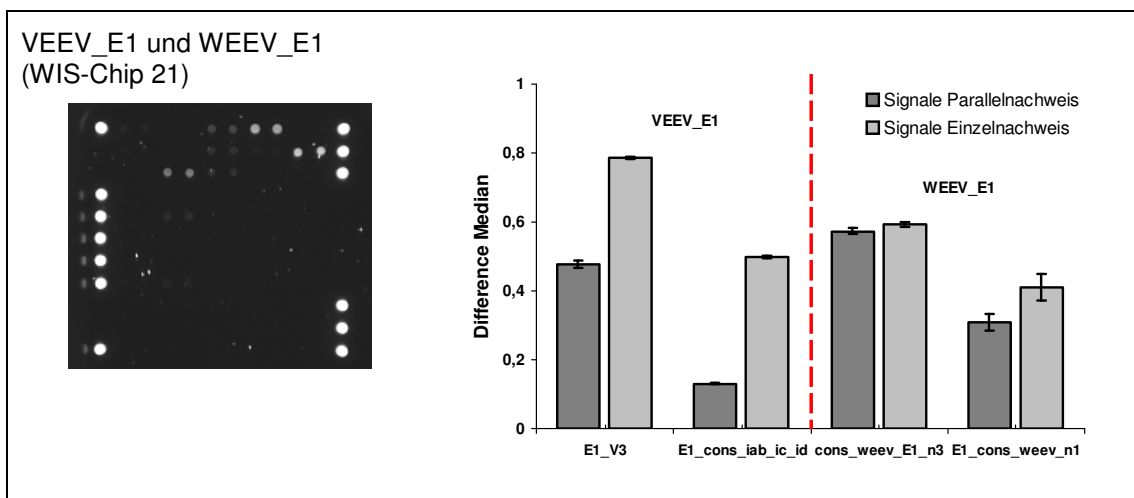


Abbildung 42: Parallelnachweis von VEEV und WEEV im E1-Gen

Der Nachweis von VEEV und WEEV im E1-Gen erfolgte mit den jeweils für den Einzelnachweis spezifischen forward und reverse Primern und je 2 µl unverdünnter VEEV- und WEEV-RNA pro 50 µl Ansatz. In den Ergebnissen sind die Signalintensitäten exemplarischer Fängersonden des Duplexnachweises den Ergebnissen der spezifischen Einzelnachweise gegenübergestellt.

Im Duplexnachweis zeigte sich eine Reduktion der Signalintensität für VEEV_E1 von 40 % für die stammspezifische Sonde E1_V3 und von 74 % für die VEEV-Consensus-Sonde. Verglichen mit dem Einzelnachweis korrelierten die VEEV_E1-Signalhöhen des Parallelnachweises mit der 1:100 bis 1:1000 Verdünnung des RNA-Templates, dies entsprach

einer Genomkopienanzahl von 1×10^4 bis 1×10^3 pro Ansatz (siehe Abbildung 35a). Die Signale für WEEV_E1 zeigten sich im Parallelnachweis stabiler – hier ergab sich für die Consensus-Sonde lediglich ein Rückgang von 3 % bzw. 25 % (Abbildung 42). Diese Signalintensitäten entsprachen im Vergleich mit dem Einzelnachweis einer 1:10 Verdünnung des spezifischen WEEV-Templates und somit einer RNA-Kopienzahl von 6×10^3 pro Ansatz (siehe Abbildung 36a). Für den VEEV_E1-Nachweis lässt sich sagen, dass die Hybridisierungssignale der Consensus-Sonde im Parallelnachweis mit anderen Viren sensibler als die stammspezifische Sonde reagierten – hier manifestierten sich Signalreduktionen stärker.

Der Nachweis von VEEV im E1-Gen und WEEV im E2-Gen steht als Beispiel für den Nachweis zweier Alphaviren in unterschiedlichen Strukturgenen. In diesem Parallelnachweis wurden von VEEV 1×10^6 KID₅₀ und von WEEV 6×10^4 KID₅₀ pro Ansatz nachgewiesen.

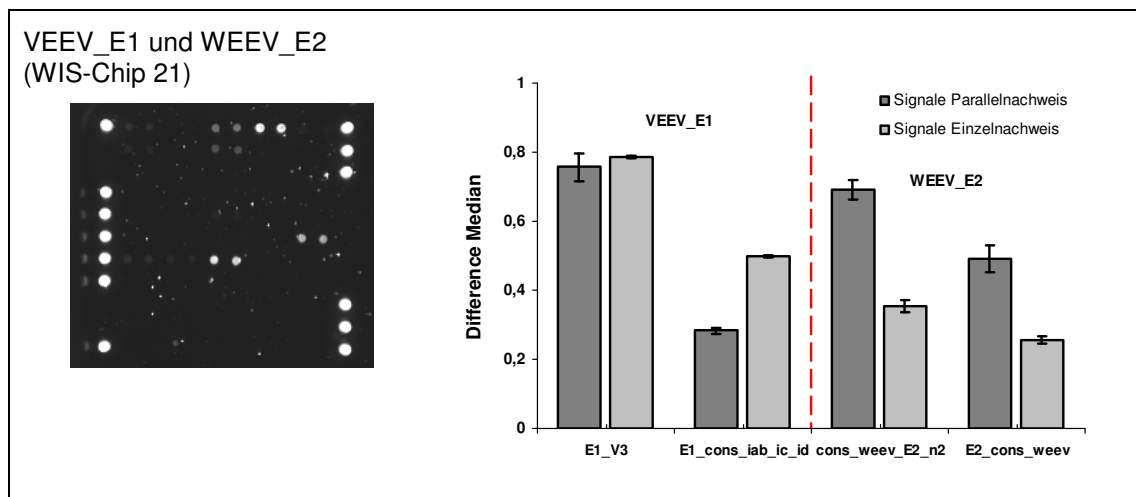


Abbildung 43: Parallelnachweis von VEEV im E1- und von WEEV im E2-Gen

Der Nachweis von VEEV im E1- und WEEV im E2-Gen erfolgte mit den jeweils für den Einzelnachweis spezifischen forward und reverse Primern und je 2 µl unverdünnter VEEV- und WEEV-RNA pro 50 µl Ansatz. In den Ergebnissen sind die Signalintensitäten exemplarischer Fängersonden des Duplexnachweises den Ergebnissen der spezifischen Einzelnachweise gegenübergestellt.

Die VEEV_E1-Consensus-Sonde zeigte wie schon in Kombination mit WEEV_E1 eine Reduktion der Signale um fast 45 %, die TC-83 spezifische Sonde E1_V3 wies mit dem Einzelnachweis identische Signalthöhen auf. Im Vergleich mit den Signalintensitäten des Einzelnachweises entsprachen die im Duplexnachweis mit WEEV_E2 für VEEV_E1 erzielten Consensus-Sonden-Signalthöhen der 1:100 Verdünnung des VEEV-Templates und somit einer Genomkopienzahl von 1×10^4 pro AP®-Kartusche (siehe Abbildung 35a). Die spezifischen Signale von WEEV_E2 stiegen dagegen um fast 100 %, ein Phänomen welches sich bei keinem anderen durchgeführten Parallelnachweis wiederholte (Abbildung 43).

5.2.4.10.2 Molekularbiologische Triplexnachweise im AP[®]-System

Der parallele Nachweis eines Alphavirus (VEEV_E1) mit zwei Flaviviren (WNV und YFV) konnte ebenfalls im AP[®]-System etabliert werden. In diesem Ansatz wurden von VEEV 1×10^6 KID₅₀, von WNV 60 KID₅₀ und von YFV $3,3 \times 10^4$ KID₅₀ nachgewiesen.

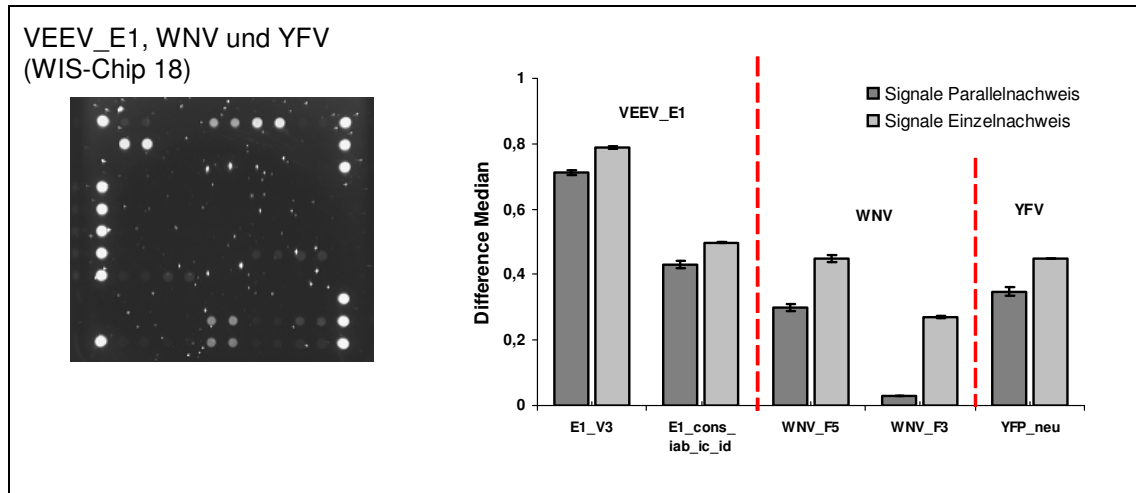


Abbildung 44: Parallelnachweis von VEEV im E1-Gen, WNV und YFV

Der Nachweis von VEEV im E1-Gen in Kombination mit den Flaviviren WNV und YFV erfolgte mit den jeweils für den Einzelnachweis spezifischen forward und reverse Primern und je 2 µl unverdünnter VEEV-, WNV- und YFV-RNA pro 50 µl Ansatz. In den Ergebnissen sind die Signalintensitäten exemplarischer Fängersonden des Triplexnachweises den Ergebnissen der spezifischen Einzelnachweise gegenübergestellt.

Im Parallelnachweis mit den Flaviviren kam es für den VEEV_E1-Nachweis nur zu geringfügigen Signalarückgängen von maximal 14 % (Abbildung 44). In Korrelation mit den Signalintensitäten des Einzelnachweises lagen die im Dreifachnachweis erzielten Werte zwischen den ermittelten Signalhöhen einer unverdünnten bis 1:10 verdünnten VEEV-RNA-Präparation (siehe Abbildung 35a), dies entsprach einer RNA-Kopienzahl von 1×10^6 bis 1×10^5 pro AP[®]-Kartusche. Die spezifische Hybridisierungssonde WNV_F3 für den WNV-Nachweis wies dagegen eine um fast 90 % reduzierte Signalintensität auf. Diese Signalthöhe wurde im Einzelnachweis mit einer 1:10 Verdünnung des RNA-Templates erzielt (siehe Abbildung 37a). Die zweite WNV-Sonde und die YFV-Sonde erzeugten im Vergleich zum jeweiligen Einzelnachweis ein um 33 % (WNV_F5) bzw. 22 % (YFP_neu) reduziertes Signal (Abbildung 44). Im Vergleich mit den im Einzelnachweis erbrachten Signalthöhen korrespondierten diese mit dem Nachweis eines unverdünnten bis 1:10 verdünnten Templates. Dies entsprach einer Genomanzahl aus dem Einzelnachweis von 6 bis 60 (WNV) bzw. $3,3 \times 10^4$ bis $3,3 \times 10^3$ (YFV) pro RT-PCR-Ansatz (siehe Abbildung 37a und b).

Um zu untersuchen, ob und mit welchen Signalhöhen ein kombinierter Nachweis von RNA- und DNA-Viren möglich ist, wurde die parallele Identifizierung von VacV mit WNV und YFV in der AP[®]-Kartusche erprobt. In diesem Triplexnachweis wurden pro AP[®]-Kartusche von VacV 2×10^3 KID₅₀, von WNV 6×10^1 KID₅₀ und von YFV $3,3 \times 10^4$ KID₅₀ nachgewiesen.

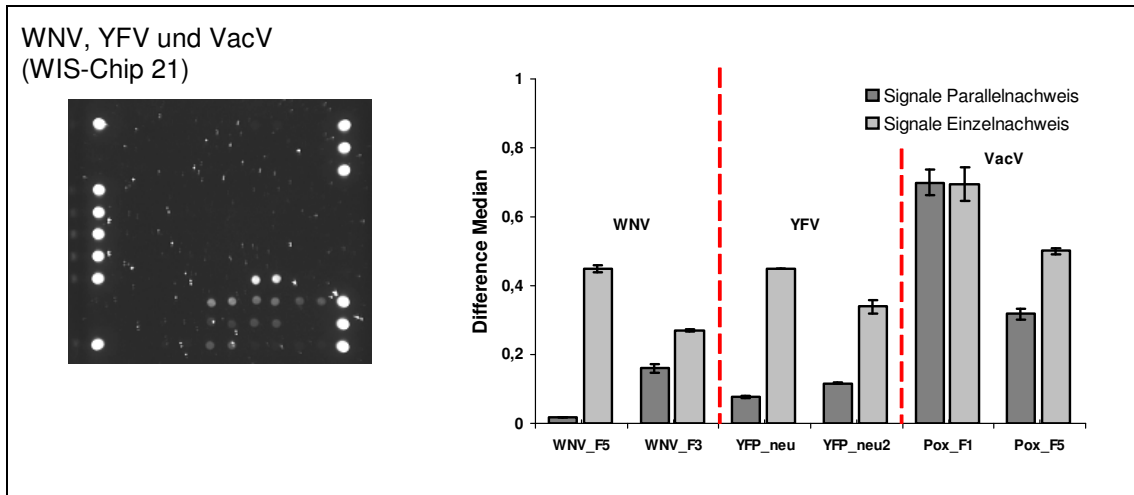


Abbildung 45: Parallelnachweis von WNV, YFV und VacV

Der Nachweis von VacV in Kombination mit den Flaviviren WNV und YFV erfolgte mit den jeweils für den Einzelnachweis spezifischen forward und reverse Primern und je 2 µl unverdünnter VacV-DNA und WNV- und YFV-RNA pro 50 µl Ansatz. In den Ergebnissen sind die Signalintensitäten exemplarischer Fängersonden des Triplexnachweises den Ergebnissen der spezifischen Einzelnachweise gegenübergestellt.

Dabei ergab sich für die spezifischen WNV-Sonden ein Signalverlust von 94 % bzw. 41 %. Diese Signalintensitäten wurden im Einzelnachweis vergleichsweise mit einer 1:10 Verdünnung des WNV-Templates erzielt, was einer RNA-Kopienzahl von 6 pro Ansatz entsprach (siehe Abbildung 37a). Für die YFV-Sonden ergab sich eine Reduktion von 83 % und 65 %. Im Vergleich zum Einzelnachweis entsprachen diese Signalintensitäten annähernd einem Nachweis eines 1:100 verdünnten YFV-Templates, also einer Kopienanzahl von $3,3 \times 10^2$ pro Ansatz (siehe Abbildung 37b). Die spezifischen Sonden für OPV erzielten im Parallelnachweis einerseits eine mit dem Einzelnachweis vergleichbare Signalhöhe bei Pox_F1 und andererseits ein um 36 % reduziertes Signal bei Pox_F5 (Abbildung 45). Die Signalhöhen korrelierten mit denen eines VacV-Nachweises mit unverdünntem bis 1:10 verdünntem Template. Dies entsprach einer DNA-Kopienzahl von 2×10^3 bis 2×10^2 pro Ansatz (siehe Abbildung 38).

Als abschließendes Multiplexexperiment wurde analysiert, ob eine parallele Identifizierung des Alphavirus WEEV im E1-Gen mit dem Flavivirus YFV und dem Orthopockenvirus VacV realisierbar ist. In dem durchgeführten Dreifachnachweis wurden pro RT-PCR-Ansatz von WEEV 6×10^4 KID₅₀, von YFV $3,3 \times 10^4$ KID₅₀ und von VacV 2×10^3 KID₅₀ nachgewiesen.

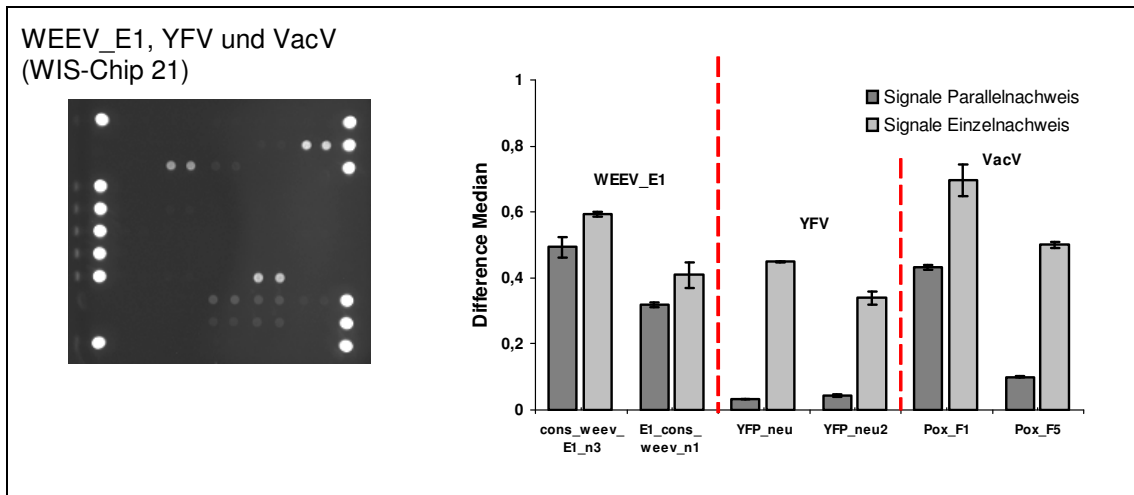


Abbildung 46: Parallelnachweis von WEEV im E1-Gen, YFV und VacV

Der Nachweis von WEEV im E1-Gen in Kombination mit YFV und VacV erfolgte mit den jeweils für den Einzelnachweis spezifischen forward und reverse Primern und je 2 µl unverdünnter WEEV- und YFV-RNA und VacV-DNA pro 50 µl Ansatz. In den Ergebnissen sind die Signalintensitäten exemplarischer Fängersonden des Triplexnachweises den Ergebnissen der spezifischen Einzelnachweise gegenübergestellt.

Dabei ergaben sich für den WEEV-Nachweis Signale, welche 83 % (cons_weev_E1_n3) bzw. 78 % (E1_cons_weev_n1) der Signale im Einzelnachweis entsprachen. Diese Signalintensitäten wurden im Einzelnachweis mit einer 1:10 Verdünnung des WEEV-Templates erzielt und entsprach einer Genomkopienzahl pro Ansatz von 6×10^3 (siehe Abbildung 36a). Die Signalintensitäten der spezifischen Hybridisierungssonden für YFV konnten im Triplex nur 8 % (YFP_neu) bzw. 13 % (YFP_neu2) der Werte des Einzelnachweises liefern. Im spezifischen Einzelnachweis von YFV konnten diese Signalhöhen mit einer RNA-Verdünnung von 1:100 bis 1:1000 erzielt werden, was mit einer RNA-Kopienzahl von $3,3 \times 10^2$ bis $3,3 \times 10^1$ pro AP®-Kartusche korrespondierte (siehe Abbildung 37b). Die Signale der virusspezifischen Sonden für VacV waren in diesem Parallelnachweis im Vergleich zum Einzelnachweis um ca. ein Drittel (Pox_F1) bzw. 80 % reduziert (Abbildung 46). Für Pox_F1 konnten diese Signalhöhen im Einzelnachweise mit einem unverdünnten bis 1:10 verdünnten VacV-Template und für Pox_F7 mit einem 1:1000 verdünnten DNA-Template realisiert werden. Dies korrelierte mit einer Genomkopienzahl von 2×10^3 bis 2×10^2 Genomkopien (Pox_F1) bzw. 2 DNA-Kopien pro RT-PCR-Ansatz (siehe Abbildung 38).

Für einige im AP[®]-System durchgeführte Parallelnachweise wurden die Ansätze nochmals extern im PCR-Gerät mittels RT-PCR amplifiziert und im Anschluss in einem Agarosegel aufgetrennt, um zu überprüfen, ob alle spezifischen PCR-Produkte in den Duplex- bzw. Triplexnachweisen gebildet wurden. In Abbildung 47 sind exemplarisch für zwei Parallelnachweise (VEEV_E1, WNV und YFV (siehe auch Abbildung 44); VacV, VEEV_E1 und WEEV_E2) die Gelelektrophorese-Aufnahmen dargestellt. Im Parallelnachweis von VEEV_E1 und den beiden Flaviviren entstanden sowohl die richtigen PCR-Amplifikate (VEEV_E1: 131 bp; WNV: 102 bp und YFV: 103 bp) als auch zum Einzelnachweis vergleichbare Amplikommengen. Der Triplexnachweis von VacV, VEEV im E1- und WEEV im E2-Gen resultierte ebenfalls in den korrekten Amplikonlängen (VacV: 145 bp; VEEV_E1: 131 bp und WEEV_E2: 173 bp) und im Vergleich zum Einzelnachweis vergleichbaren PCR-Produktmengen (Abbildung 47). Aus diesen Daten wurde gefolgert, dass eine Signalreduktion im AP[®]-System nur durch eine Interaktion der verschiedenen PCR-Produkte untereinander in der Kartusche z.B. durch unspezifische Bindungen aneinander – obwohl laut Sequenz keine Komplementarität besteht – verursacht werden kann.

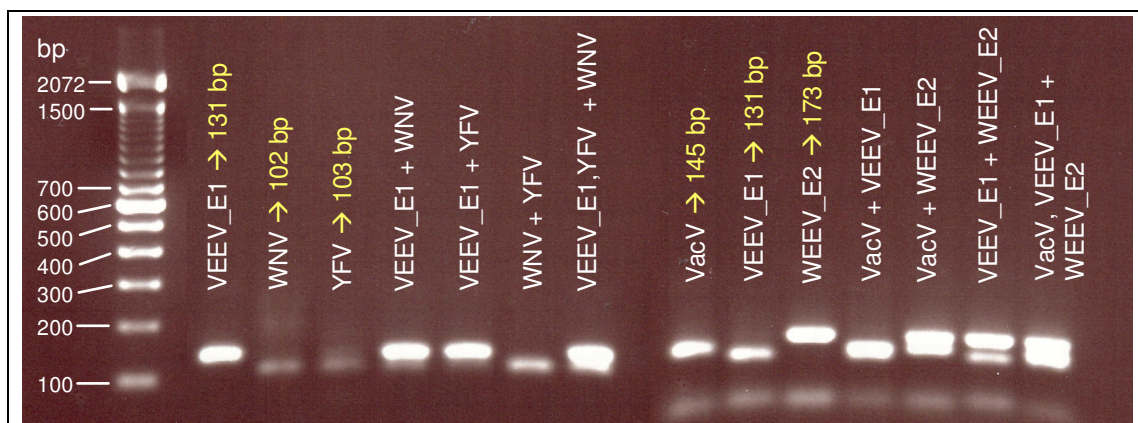


Abbildung 47: Agarose-Gelelektrophorese spezifischer viraler Multiplex-Nachweise im Vergleich mit den Einzelnachweisen

Für die Untersuchung, ob bei einem molekularbiologischen Parallelnachweis eine vergleichbare Produktmenge wie in den entsprechenden Einzelnachweisen gebildet wird, wurden je sieben RT-PCR-Ansätze mit den drei spezifischen Primerpaaren und den korrespondierenden Templates für den Einzel- (3 Ansätze), Duplex- (3 Ansätze) und Triplexnachweis (1 Ansatz) versetzt. Die Analyse erfolgte für den Parallelnachweis von VEEV_E1 in Kombination mit YFV und WNV und von VEEV_E1 mit WEEV_E2 und VacV. Nach der Prozessierung wurden die Amplikons in einem 1,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die gebildeten Produktmengen der Einzel- und Parallelnachweise sind miteinander vergleichbar.

5.2.4.11 Intra- und Interassay-spezifische Variabilität im molekularbiologischen AP[®]-Nachweis

Um eine Aussage über die Konstanz der Signalintensitäten beim molekularbiologischen Nachweis treffen zu können, wurde die intra- und interassay-spezifische als auch die zwischen verschiedenen AP[®]-Chargen auftretende Variabilität untersucht. Dabei ergaben sich für einen gleichzeitigen Nachweis von VEEV im E1-Gen in zwei Kartuschen (n=2) eine Signalabweichung von 0,7 % bei der TC-83 spezifischen Sonde E1_V3 bzw. von 4,3 % bei der VEEV-Consensus-Sonde (Abbildung 48a). Im Vergleich ergaben sich zudem zwischen einer über 5 Monate bei 4°C gelagerten und einer neu gespotteten und gefertigten Charge keine signifikanten Unterschiede in der Signalintensität bei einem zeitgleich durchgeführten VEEV_E1-Nachweis (Abbildung 49).

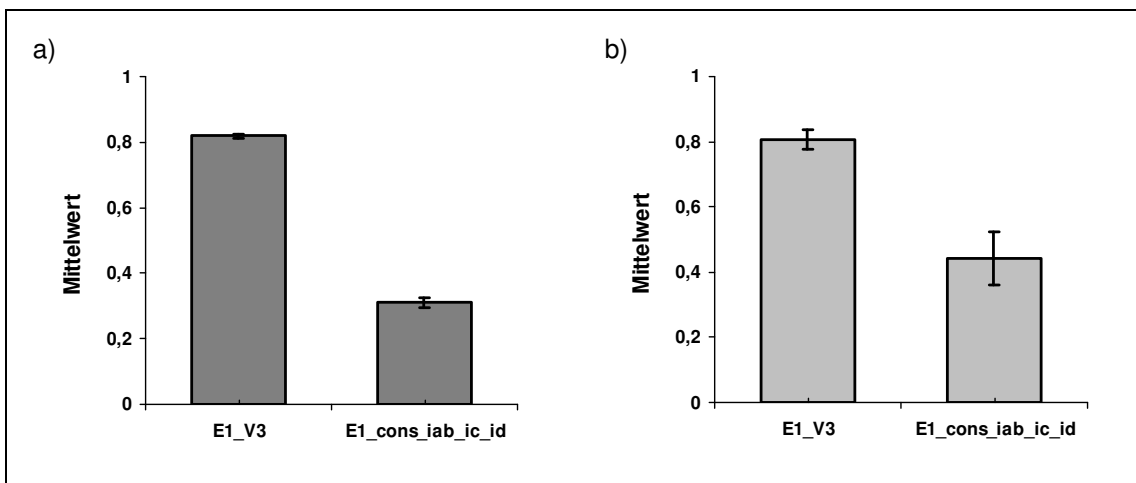


Abbildung 48: Intra- und Interassay-spezifische Variabilität des molekularbiologischen Nachweises von VEEV im E1-Gen

a) Intraassay-spezifische Variabilität des VEEV_E1-Nachweises: Ein Doppelansatz wurde am selben Tag in zwei Kartuschen prozessiert (n=2); b) Interassay-spezifische Variabilität des VEEV_E1-Nachweises: Durchschnittliche spezifische Signalintensitäten von 20 Kartuschen (n=20), welche über 17 Monate zum Nachweis von VEEV TC-83 im E1-Gen prozessiert wurden. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der TC-83-spezifischen Sonde E1_V3 und der VEEV-Consensus-Sonde E1_cons_iab_ic_id.

Für die interassay-spezifische Variabilität wurden die Signalintensitäten von 20 Kartuschen, welche zwischen November 2008 und März 2010 mit identischem Reaktionsmix und Standard-RT-PCR-Programm zum Nachweis von VEEV TC-83 im E1-Gen im AP[®]-System prozessiert wurden, verglichen. Dabei ergab sich für die stammspezifische Sonde (E1_V3) eine Variabilität der Signale von 3,9 % und für die Consensus-Sonde (E1_cons_iab_ic_id) von 18,6 % (Abbildung 48b).

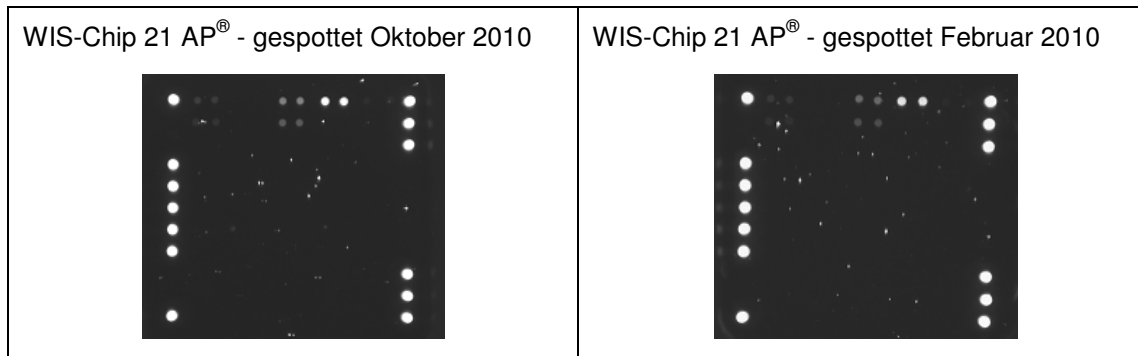


Abbildung 49: Einfluss des Kartuschenalters auf die Signalintensitäten des molekular-biologischer VEEV_E1-Nachweises

Der VEEV_E1-Nachweis erfolgte als Doppelansatz zeitgleich in zwei verschiedenen Chip-Chargen des Biochips 21 AP[®]. Zum Zeitpunkt des Nachweises (März 2010) waren die Kartuschen fünf bzw. einen Monat im Kühlschrank bei 4 °C gelagert worden.

Die im Vergleich zur stammspezifischen Sonde höhere Variabilität (hier ausgedrückt durch die Standardabweichung) der VEEV-Consensus-Sonde lässt sich durch das Berechnungsprinzip für die Signale erklären. Das Auswerteprogramm PocLab2 rechnet aus der gemessenen Signalintensität (Intensity Median Norm: maximal 1,0) den Hintergrund (Background Median Norm), welcher in einem Bereich zwischen 0,13 und 0,16 liegt, heraus. Somit ergibt sich eine maximale Signalintensität (Difference Median Norm) von 0,84 bis 0,87. Der Nachweis von VEEV im E1-Gen ergibt für die TC-83-spezifische Sonde Signale, welche bei einer Belichtungszeit von 10 s annähernd dieses Maximum erreichen – sie befinden sich in der optischen Sättigung. Das heißt, dass eine Variation des Wertes über das Maximum hinaus nicht erfasst wird. Bei einer Reduzierung der Belichtungszeit auf 5 s ergeben sich somit Werte, welche durchaus im Bereich von 0,5 liegen können – dies entspräche einer gemessenen Signalintensität (IntensityMedianNorm) von 1,13 bis 1,16 bei einer Belichtung von 10 s. Das Programm PocLab2 skaliert alle Messwerte zwischen 0 und 1, daher ergibt sich im Maximalbereich der Skala eine Stauchung der Werte und somit eine geringere Variabilität als bei Sonden, welche Signalintensitäten im mittleren Messbereich (IntensityMedianNorm zwischen 0,4 und 0,6) erbringen. Als reale interassay-spezifische Variabilität ist somit ein Wert zwischen 10 % und 20 % anzusehen, dieser konnte durch einen Vergleich der Signalintensitäten der VEEV-Consensus-Sonde von 20 Kartuschen bestätigt werden (Abbildung 48b) und ist vermutlich auf minimale Pipettierabweichungen und Konzentrationsunterschiede zurückzuführen.

6 Diskussion

Das AP[®]-System ist ein tragbares Nachweisgerät, welches die Fähigkeit, einen immunologischen und molekularbiologischen Nachweis durchzuführen, vereint. Somit besteht die Möglichkeit, Viren und Bakterien aufgrund ihrer Antigene oder aber ihrer beinhaltenden Nukleinsäure zu identifizieren. Der Nachweis von Toxinen muss im AP[®]-System immunologisch erfolgen, da diese selbst keine Nukleinsäure besitzen. Die Nachweise können im selben Gerät abhängig von den immobilisierten Fänger-Molekülen auf Basis eines Sandwich-ELISAs bzw. einer PCR oder RT-PCR durchgeführt werden. In der AP[®]-Kartusche finden die spezifischen Nachweise in einem vollständig abgeschlossenen Reaktionsraum statt. Dies erlaubt eine unterbrechungsfreie Prozessierung der spezifischen Nachweise ohne Fluidik. Die Kartuschen können nach der Prozessierung ohne weiteren Flüssigabfall entsorgt werden, eine Kontaminationsgefahr mit potentiell infektiösem Material ist somit nicht gegeben.

Sowohl für die immunologische als auch die molekularbiologische Identifikation von mikrobiellen Agenzien im AP[®]-System gilt, dass intensive Optimierungen der Nachweise für den routinemäßigen Einsatz nötig sind.

6.1 Immunologischer Antigen-Nachweis im AP[®]-System

Verschiedene Parameter sind bei immunologischen Biochip-Analysen notwendige Voraussetzung für die spezifische und sensitive Identifizierung von B-Agenzien. Neben den optimalen Prozessierungskonstanten zählen dazu unter anderem eine homogene Spotmorphologie (siehe 5.1.2), eine effiziente Markierung der Nachweis-Antikörper und die Reproduzierbarkeit von Signalintensitäten im Assay (siehe 5.1.1). Neben einer mit anderen immunologischen Nachweissystemen vergleichbaren Detektionsgrenze musste der Nachweis verschiedener Viren in der AP[®]-Kartusche ohne Zeitverzögerung durchführbar sein, um den Ansprüchen eines schnellen Biodetektor-Systems gerecht zu werden.

In dieser Arbeit wurden für das AP[®]-System ein universeller Reaktionsmix und ein Prozessierungsprogramm für den Nachweis von Viren, Bakterien und Toxinen etabliert, welche eine spezifische Identifikation innerhalb von 30 Minuten erlauben.

In den durchgeführten Experimenten hat sich gezeigt, dass sowohl die Fänger- als auch die Nachweis-Antikörper vor ihrem Einsatz im AP[®]-System auf ihre Anwendbarkeit für diesem ungewöhnlichen experimentellen Aufbau („Ein-Topf-Reaktion“) evaluiert werden müssen. Dabei steht die Reduktion der Kreuzreaktionen mit anderen Antikörpern, welche aufgrund fehlender Waschschrte vermehrt auftreten, ohne einen signifikanten Verlust der Signalintensität hervorzurufen, im Vordergrund.

Tabelle 24 stellt die bisher ermittelten spezifischen Nachweisgrenzen für *E.coli*, Ricin, das Vaccinia-Virus und die untersuchten Alphaviren im AP[®]-System den am WIS etablierten immunologischen Nachweissystemen (ArrayTube-System (AT) und MKT-ELISA) gegenüber. Das AT-System ist eine Microarray-Plattform der Firma Clondia (jetzt Alere Technologies, Jena, D), welche eine immunologische Reaktion im Sandwich-ELISA mit Waschschritten und verkürzter Prozessierungszeit ermöglicht [137].

Das Vaccinia- und das VEE-Virus sowie *E.coli* und Ricin wurden im AP-System titriert (siehe 5.1.3.1, 5.1.3.2, 5.1.3.4 und 5.1.3.5). Dabei ergab sich für das Orthopockenvirus VacV eine Nachweisgrenze von 1×10^4 KID₅₀/ml und für VEEV 4×10^6 KID₅₀/ml. Diese Nachweisgrenzen reichen an die Detektionsgrenzen des AT-Systems bzw. herkömmlicher ELISA-Verfahren heran; es ergab sich lediglich eine Abweichung von maximal einer 10er-log-Stufe. Zudem erfordert die AP[®]-Detektion mit 30 Minuten nur einen Bruchteil der Zeit eines klassischen immunologischen Nachweises (MKT-ELISA).

Tabelle 24: Vergleich der Detektionsgrenzen von ausgewählten B-Agenzien in immunologischen Assays

	Nachweisgrenze pro ml		
	Protein-AP [®] -System	ArrayTube-System (AT) ⁴	ELISA ⁵
<i>E.coli</i> O157:H7	2×10^3 cfu	2×10^3 cfu	$< 2 \times 10^3$ cfu
Ricin (Rohtoxin)	100 ng	$\leq 0,1$ ng	0,05 – 0,1 ng
Ricin (Reintoxin)	20 ng	$\leq 0,1$ ng	0,3 ng
CHIKV	$7,1 \times 10^5$ KID ₅₀	$7,1 \times 10^4$ KID ₅₀	$1 - 4 \times 10^4$ KID ₅₀
EEEV	$7,1 \times 10^8$ KID ₅₀	$7,1 \times 10^8$ KID ₅₀	$5 \times 10^6 - 1 \times 10^8$ KID ₅₀
VEEV TC-83	4×10^6 KID ₅₀	$1 - 1,8 \times 10^6$ KID ₅₀	$1 - 4 \times 10^5$ KID ₅₀
WEEV	4×10^6 KID ₅₀	4×10^6 KID ₅₀	$1 - 5 \times 10^5$ KID ₅₀
Dengueviren	Nicht möglich	$3,6 \times 10^4$ KID ₅₀ (DenV1)	$1,4 \times 10^4$ KID ₅₀ (DenV1)
		$1,8 \times 10^4$ KID ₅₀ (DenV3)	$1,8 \times 10^4$ KID ₅₀ (DenV3)
		$6,5 \times 10^4$ KID ₅₀ (DenV4)	$2,6 \times 10^4$ KID ₅₀ (DenV4)
WNV	Nicht möglich	$1,3 \times 10^3$ KID ₅₀	$1,3 \times 10^2$ KID ₅₀
YFV	Nicht möglich	$6,5 \times 10^5$ KID ₅₀	$1,3 \times 10^5$ KID ₅₀
Vaccinia-Virus	1×10^4 KID ₅₀	$1,3 - 5 \times 10^3$ KID ₅₀	$2 - 5 \times 10^3$ KID ₅₀

⁴ Daten des Biologischen Zentrallabors – Abteilung Virologie (WIS) – teilweise veröffentlicht in [138]

⁵ Daten des Biologischen Zentrallabors – Abteilung Virologie (WIS)

E.coli konnte im Einzelnachweis bis zu einer Keimzahl von 2×10^3 cfu/ml nachgewiesen werden, dies entspricht der Nachweisgrenze im AT-System [138]. Dabei zeigte sich bei Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop, dass das in der Bakterienpräparation vorhandene lösliche Antigen im Vergleich zum partikulären Antigen zu einem Großteil der Detektionssignale beitrug.

Ricin als Reintoxin konnte bis zu einer Konzentration von 20 ng/ml detektiert werden, das Rohtoxins bis 100 ng/ml. Die Nachweisgrenzen liegen hierbei mit einem Faktor 100 bis 1000 deutlich über den im AT- und ELISA-System erzielten Detektionsgrenzen (Tabelle 24).

Der immunologische Nachweis von YFV, WNV und DenV konnte im AP[®]-System nicht realisiert werden. Bereits im ELISA etablierte Antikörper-Paare für die immunologische Identifikation der Flaviviren erbrachten keine zufriedenstellenden Signalintensitäten (siehe 5.1.3.3). Eine mögliche Erklärung stellt wiederum das Reaktionsprinzip in der Kartusche dar. Da in den „Ein-Topf-Reaktionsmix“ sowohl das nachzuweisende Antigen als auch der Nachweis-Antikörper gegeben wird, ist eine vorzeitige Bindung beider Komponenten aneinander nicht ausgeschlossen. Unter Umständen kann dies auch bei sofortiger Injektion in die Kartusche dazu führen, dass sämtliche Ak-spezifische Epitope des viralen Antigens bereits von NW-Antikörpern bedeckt sind bzw. sich die unterschiedlichen Epitope von Fänger- und Nachweis-Antikörper in räumlicher Nähe zueinander befinden, so dass es zu einer sterischen Behinderung der Bindung an den Fänger-Antikörper kommt. Eine zeitlich voneinander abgegrenzte, aufeinander folgende Injektion des Antigens und des Antikörpers in den AP[®]-Reaktionsraum, um zu verhindern, dass die Reaktionskomponenten bereits außerhalb der Kartusche miteinander reagieren, führte zu keiner Verbesserung der Signalintensitäten beim immunologischen Virusnachweis.

Mithilfe der Affinitätsbestimmung von Antikörpern zu ihrem spezifischen Antigen könnte eine Grundlage für die Selektion geeigneter Antikörper-Paare geschaffen werden. Mit dem genauen Wissen der Dissoziationskonstante K_d ließe sich austesten, ob ein hoch-affiner Fänger-Antikörper in Kombination mit einem niedrig-affinen Nachweis-Antikörper in der „Ein-Topf-Reaktion“ höhere und konstantere Signalintensitäten erzeugt, da sich theoretisch zuerst ein Fänger-Antikörper-Antigen-Komplex ausbilden würde, welcher im Anschluss vom Nachweis-Antikörper gebunden würde. Ob es somit zu einer gestaffelten Bindungsreaktion in der Kartusche – unabhängig von nacheinander folgenden Inkubations- und Waschschritten – kommt, bleibt zu überprüfen.

Der Vergleich verschiedener VEEV-Präparationen und die Untersuchung der Signalintensitäten unterschiedlicher Ricin-Aufreinigungen zeigten, dass die Antigenstandardisierung für die immunologische Identifikation eine substanzielle Rolle spielt. Der variable Anteil an Tot-Antigen innerhalb verschiedener Viruspräparationen bzw. der Toxingehalt unterschiedlicher Ricin-Aufarbeitungen kann zu einem signifikanten Unterschied in den spezifischen Signalintensitäten führen und stellt somit eine entscheidende Variable innerhalb des biologischen Nachweissystems dar (siehe 5.1.1).

Bei den im AP[®]-System durchgeführten Multiplex-Versuchen zeigte sich, dass optimierte Reaktionsparameter des Einzelnachweises nicht eins-zu-eins auf den Parallelnachweis übertragen werden können (siehe 5.1.4). Die parallele Detektion von Viren, Bakterien und/oder Toxinen bedarf einer weitreichenden Optimierung. Einige der untersuchten Antigene interagierten in der „Ein-Topf-Reaktion“ innerhalb der AP[®]-Kartusche miteinander, was teilweise zum totalen Signalausfall bzw. einem starken Signalrückgang aller im Ansatz vorhandenen B-Agenzien führte. Beispielhaft ist hier die Positivkontrolle *E.coli* in Kombination mit VEEV zu nennen. Die im Singleplex etablierte gute Detektion von *E.coli* scheint im Parallelnachweis des AP[®]-Systems aufgrund der massiven Signalverluste als allgemeine Positivkontrolle daher nicht geeignet zu sein. Alternativ könnte die Positivkontrolle jedoch unabhängig von der zu analysierenden Probe in einer zweiten Kartusche prozessiert werden.

Ladungseffekte könnten diese beobachteten Signalverluste bzw. -ausfälle bei den Multiplex-Nachweisen zum Teil erklären. Durch diese wird wahrscheinlich eine Interaktion der beiden Antigene möglich. Die Interaktion entgegengesetzt geladener Antigene miteinander (z.B. positiv geladenes Ricin mit negativ geladenem *E.coli*) könnte so die Bindung eines Antigens sowohl an seinen Nachweis- als auch an den Fänger-Antikörper sterisch hindern bzw. zu einer Komplexbildung der Antigene untereinander führen.

Eine eins-zu-eins Übertragung von etablierten Nachweisen auf Basis eines Sandwich-ELISAs mit Waschschritten auf das AP[®]-System ist nicht möglich. Jedes bereits charakterisierte Antikörper-Paar muss nochmals hinsichtlich seiner Eignung für die „Ein-Topf-Reaktion“ und der Antikörper-Konzentration für eine bestmögliche Signalausbeute ausgetestet werden. Zudem wirft das AP[®]-System neue Probleme mit unspezifischen Kreuzreaktionen auf, welche in klassischen immunologischen Nachweisen (z.B. ELISA) nie ausgetestet wurden.

Es wurde untersucht, ob ein Waschschritt des Biochips nach dem Spotten und vor dem Einbau in die Kartusche zu einer Verminderung der beobachteten Unspezifitäten und zur Verbesserung und Stabilisierung der Signalintensitäten durch das Entfernen überschüssiger Fänger-Antikörper führt. Es kam durch den Waschschritt zu einer unmittelbaren Bindung des Antikörper-Überschusses an die nicht blockierten Bereiche (Zwischenräume) des Proteinchips und somit beim Antigen-Nachweis zu deutlichen Verlaufsspuren (siehe 5.1.1 und Abbildung 11). Es bleibt jedoch kritisch anzumerken, dass durch die erfolgte Nachbehandlung der Antikörper-Überschuss nicht tatsächlich aus der Kartusche entfernt wurde. Laut der erhaltenen Daten wurde der Überschuss lediglich in den Spotzwischenräumen erneut immobilisiert und steht somit ebenfalls für die Antigen-Bindung zur Verfügung. Ein zusätzlich eingeführter Blockierungsschritt der Proteinchips z.B. mit Triethanolamin nach dem Spotten bzw. vor dem Waschen der Chips könnte das „Verlauf-Problem“ lösen.

Eine firmenseitige bauliche Veränderung der Kartusche mit der Einarbeitung eines Dorns, welcher eine zeitlich voneinander getrennte, aufeinander folgende Injektion von Antigen- und Nachweis-Antikörper-Lösung erlaubt, könnte weiterhin zu einer Verbesserung der immunologischen Nachweissignale führen. Diese Modifikation in der Kartuschen-Konstruktion könnte ebenso für eine Optimierung des molekularbiologischen Nachweises – angesichts der Möglichkeit einer Injektion hybridisierungsfördernder Puffer nach der PCR und vor der Hybridisierung – genutzt werden.

6.2 Molekularbiologischer Virusnachweis im AP[®]-System

In den Experimenten für den molekularbiologische Nachweis von Viren im AP[®]-System wurden verschiedenste Parameter zur Optimierung von PCR-Amplifikation und Hybridisierung und somit der Detektion und Identifikation untersucht. Im AP[®]-System stellte sich die Herausforderung, zwei molekularbiologische Reaktionen in Einklang zueinander zu bringen: die spezifische Amplifikation und die Hybridisierung. Beide Reaktionen bedürfen unterschiedlicher pH- und Pufferbedingungen um optimal abzulaufen.

Im Zuge der Experimente hat sich gezeigt, dass eine Zugabe von hybridisierungsfördernden Salzen (z.B. SSC-Puffer oder Kaliumacetat) schon in geringen Konzentrationen die Detektion von RNA-Viren unterbindet, da sie die Reverse Transkription inhibierten. Da aber ein Großteil der nachzuweisenden Viren RNA-Organismen sind und somit deren Nachweis auf die salzemfindliche RT-PCR angewiesen ist, wurde entschieden die nachfolgenden Experimente ohne zusätzliche hybridisierungsfördernde Salze durchzuführen (siehe 5.2.4.1).

Da es im Laufe dieser Arbeit nicht möglich war, die Signalintensität durch stringendere Hybridisierungsbedingungen zu verbessern, wurde versucht die Produktausbeute des Fluoreszenz-markierten Amplikon-Stranges bei der RT-PCR zu erhöhen. Dies gelang signifikant durch eine asymmetrische PCR, d.h. der reverse Primer wurde in der doppelten Konzentration im Vergleich zum forward Primer eingesetzt (siehe 5.2.4.3). Eine Erhöhung der Enzymmenge für die RT-PCR-Reaktion resultierte nicht in einer Signalverstärkung, sondern führte generell zu einem Rückgang der spezifischen Signale (siehe 5.2.4.2). Eine Anhebung der Extensionstemperatur von 60°C auf 72°C, wie vom Hersteller des OneStep RT-PCR Kits empfohlen, führte ebenfalls zu keiner Verbesserung der Signalintensität (siehe 5.2.4.4).

Im Rahmen der Optimierungsarbeiten wurde untersucht, welche Parameter des Prozessierungsprogrammes zeitlich eingeschränkt werden können, um ein schnelleres Ergebnis bei gleich bleibender Signalthöhe zu erhalten (siehe 5.2.4.5).

Die möglichen Stellschrauben für den Virusnachweis im AP[®]-System sind die Extensionszeit, die PCR-Zyklenzahl und die Hybridisierungszeit. In umfangreichen Experimenten wurden diese Parameter am VEEV_E1-Nachweis einzeln ausgetestet und im Anschluss überprüft, ob eine Zeitersparnis durch die Kombination der einzeln zeitoptimierten Parameter im Programmablauf möglich ist. Es ergab sich, dass eine Zeitersparnis von einer halben Stunde bei Signalreduktionen von 10 % bei der TC-83-spezifischen und von 45 % bei der Consensus-Sonde möglich ist (siehe 5.2.4.6). Bei anderen Nachweisen, welche bisher

keine so hohen Signalintensitäten von 0,7 bis 0,8 wie die VEEV-Identifikation im E1-Gen hervorbringen, entscheidet hingegen die zeitliche Einsparung über einen Detektionserfolg.

Allgemein zeigte sich in Bezug auf die Fängersonden eine deutliche Abhängigkeit der Signalintensität von der Bindungsposition innerhalb des PCR-Amplikons. Nachweise, welche auf spezifischen Sonden basierten, deren Bindungsstelle im Cy5-gelabelten Amplikonstrang mittig bzw. zu dessen 3'-Ende hin orientiert war, resultierten in geringen ($< 0,1$) bzw. keinen Signalen. Im Gegensatz dazu waren die Bindungsstellen von Fänger-Oligonukleotiden, welche bei einem spezifischen Virusnachweis hohe Signalintensitäten von 0,7 bis 0,8 hervorbrachten (z.B. E1_V3 beim VEEV_E1-Nachweis), zum 5'-Ende des markierten nachzuweisenden Einzelstranges hin orientiert (siehe 5.2.4.7).

Dies kann durch den Fakt erklärt werden, dass es bei einer Sonde, welche den Cy5-markierten Amplikonstrang an dessen 5'-Ende bindet, nicht zu einem langen 5'-Überhang des Amplikons mit dem gebundenen Fluoreszenz-Label kommt. Hybridisiert dagegen der markierte Einzelstrang mit seinem 3'-Ende an die Fängersonde, kommt es, abhängig von der Länge des Amplikons, zu einem 5'-Nukleotidüberhang des Amplikons an der Oberfläche des Biochips, welcher ein sterisches Hindernis für die Bindung zwischen Target und Sonde darstellt. In Abbildung 50 ist eine schematische Darstellung des Modells gezeigt.

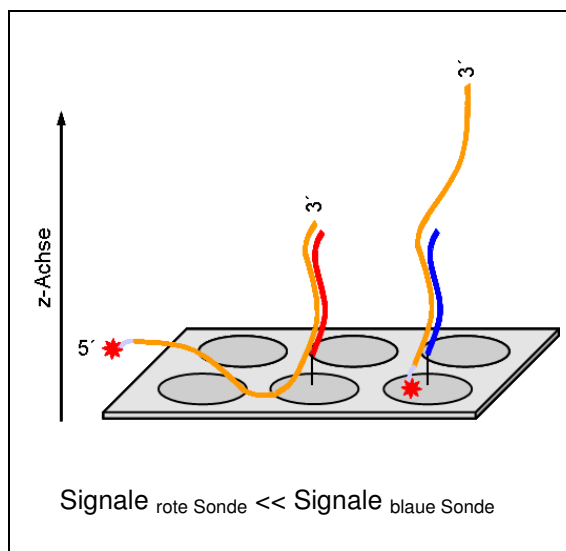


Abbildung 50: Schematische Darstellung der theoretischen Bindungsereignisse bei einem molekularbiologischen Nachweis mit Oligonukleotidsonden im AP®-System

Die Fängersonden sind in ihrer gesamten Sequenz zum Cy5-markierten PCR-Strang komplementär. Ist die Bindungsposition der Sonde innerhalb des Amplikons zu dessen 3'-Ende orientiert, kann es zu einer sterischen Behinderung durch den entstehenden 5'-Überhang an der Biochip-Oberfläche und damit zu einem massiven Signalverlust kommen (rote Sonde). Hybridisiert die Sonde aber mit dem 5'-Abschnitt des Fluoreszenz-Stranges, entsteht nur ein 3'-Überhang in Richtung der z-Achse des Biochips, welcher keinen Einfluss auf die Signalintensität des spezifischen Nachweises hat (blaue Sonde).

Abweichend von früheren Veröffentlichungen [209] ergab sich bei der Untersuchung der Hybridisierungssonden für den 3'-Überhang des Amplikons, welcher in den Kartuschenraum (in Richtung z-Achse des Biochips) ragt, keinerlei Abhängigkeit zwischen dessen Länge und der erzielten Signalintensität.

Des Weiteren zeigten degenerierte Fängersonden, welche aufgrund von Abweichungen zwischen verschiedenen Virusstämmen im Alignment ein Inosin anstelle einer spezifischen Base enthielten, eine geringere Signalthöhe im Vergleich zu einer deckungsgleichen Sonde ohne Inosin (siehe 5.2.4.7: Nachweis VEEV_E2). Dies ist der energetisch ungünstigeren Basenpaarung von Inosin mit den vier möglichen Nukleinbasen im Vergleich zu den Standard-Basenpaarungen A-T und G-C geschuldet [208].

Die Sonden, welche auf dem Biochip immobilisiert wurden, variierten in ihrer Länge zwischen 22 und 34 Nukleotiden, wobei sich ein Großteil über 26 bis 29 Nukleotide erstreckte. Da die Sensitivität mit der Länge der Hybridisierungssonden steigt [160,174], die Spezifität aber bei kurzen Oligonukleotiden am größten ist [175-179], stellt die ausgewählte Länge der Fängersonden von ca. 30 nt einen guten Kompromiss für die molekularbiologische Identifikation BWA-relevanter Viren mittels Microarrays dar.

Eine weitergehende Verstärkung der spezifischen Signale der Fängersonden und eine damit verbundene Verbesserung der bisherigen Nachweisgrenzen könnte eventuell durch das Spotten von Wobble-Sonden auf den Biochip erfolgen. Während der Synthese der Oligonukleotidsonden würden an definierten Positionen innerhalb der Sonde anstelle einer spezifischen Base zwei, drei oder alle vier Nukleotide in die Reaktion gegeben. Somit entsteht eine Mischung aus Sonden, welche sich an den definierten Positionen unterscheiden und Amplifikate mit abweichenden Sequenzen binden können.

Alternativ könnte die Immobilisierung der Sonden über ihr 5'-Ende erfolgen. Für den Nachweis würde der virusspezifische forward Primer anstelle des reverse Primers Fluoreszenz-markiert eingesetzt. Unter der Voraussetzung, dass sich dieses Nachweisprinzip zu dem bisher verwendeten ähnlich verhält, ist davon auszugehen, dass die Bindungsposition der spezifischen 5'-immobilisierten Sonde am 3'-Ende des markierten Einzelstranges höhere Signale hervorbringt als bei Bindungsstellen am 5'-Ende des Cy5-markierten PCR-Produktes.

Weiterhin könnte das Spotten von Sonden für Sense und Antisense-Strang des Amplikons zu einer Signalverbesserung beitragen. In einem PCR- bzw. RT-PCR-Reaktionsansatz mit Fluoreszenz-markiertem forward und reverse Primer entsteht bei der Amplifikation ein PCR-Produkt, welches aus zwei Cy5-markierten Einzelsträngen besteht. Die Sondenmischung für die Hybridisierung könnte aus einer den Antisense-Strang bindenden 3'-immobilisierten Fängersonde und einer zu dieser Sonde komplementären 5'-immobilisierten Hybridisierungssonde bestehen, welche den Sense-Strang bindet [210].

Eine andere Möglichkeit besteht in der Mischung von 3'- und 5'-immobilisierten Sonden, welche nicht zueinander komplementär sind. Beide Sonden weisen innerhalb des Amplikons Bindungspositionen auf, welche gewährleisten, dass sich keine langen Amplikonüberhänge an der Biochip-Oberfläche bilden. Das heißt, dass der durch den Fluoreszenz-markierten forward

Primer gebildete Sense-Strang an seinem 3'-Ende von einer 5'-immobilisierten Sonde gebunden wird, wohingegen eine über ihr 3'-Ende an die Biochip-Oberfläche gebundene zweite Sonde an das 5'-Ende des vom Cy5-gelabelten reverse Primer gebildeten Antisense-Stranges hybridisiert.

Alle Alpha-, Flavi- und Orthopockenviren konnten im AP[®]-Einzelnachweis molekularbiologisch detektiert werden. Die spezifischen Nachweisgrenzen und deren Gegenüberstellung mit den ermittelten Detektionsgrenzen in der rt PCR bzw. rt RT-PCR kann Tabelle 25 entnommen werden. Die Nachweisgrenzen der Alphaviren lagen sowohl für EEEV, VEEV als auch WEEV im E2-Gen um je eine 10er-log-Stufe höher als im E1-Gen. Während für EEEV die Nachweisgrenze im E1-Gen bei 5×10^3 KID₅₀/ml lag, konnte dasselbe Virus im E2-Gen maximal bis zu einem Titer von 5×10^4 KID₅₀/ml nachgewiesen werden. Ähnlich verhielt es sich für VEEV (Nachweisgrenze im E1-Gen: $2,2 \times 10^4$ KID₅₀/ml; im E2-Gen: $2,2 \times 10^5$ KID₅₀/ml) und WEEV (Nachweisgrenze im E1-Gen: $1,3 \times 10^4$ KID₅₀/ml; im E2-Gen: $1,3 \times 10^5$ KID₅₀/ml) (Tabelle 25 und 5.2.4.8). Diese Besonderheit des Unterschiedes in den Nachweisgrenzen zwischen den beiden Strukturgenen E1 und E2 konnte im real-time-System nur für das Alphavirus EEEV gezeigt werden.

Tabelle 25: Vergleich der Detektionsgrenzen von ausgewählten B-Agenzien in molekularbiologischen Assays

	Nachweisgrenze [KID ₅₀ /ml]	
	DNA-AP [®] -System	real-time (RT-)PCR ⁶
EEEV	5×10^3 (E1-Gen)	5×10^3 bis 5×10^2 (E1-Gen)
	5×10^5 - 5×10^4 (E2-Gen)	5×10^3 (E2-Gen)
VEEV	$2,2 \times 10^4$ (E1-Gen)	$2,2 \times 10^2$ (E1-Gen)
	$2,2 \times 10^5$ (E2-Gen)	$2,2 \times 10^2$ (E2-Gen)
WEEV	$1,3 \times 10^5$ - $1,3 \times 10^4$ (E1-Gen)	$1,3 \times 10^2$ (E1-Gen)
	$1,3 \times 10^5$ (E2-Gen)	$1,3 \times 10^2$ (E2-Gen)
WNV	$1,3 \times 10^3$ - $1,3 \times 10^2$	$1,3 \times 10^0$
YFV	$7,1 \times 10^3$	$7,1 \times 10^3$
Vaccinia-Virus	1×10^3	1×10^1 bis 1×10^0

⁶ Daten des Biologischen Zentrallabors – Abteilung Virologie (WIS)

Nur für das Gelbfieber-Virus konnte eine mit der rt RT-PCR vergleichbare Nachweisgrenze in der AP[®]-Kartusche erzielt werden. Die Detektionsgrenzen der anderen Viren (EEEV, VEEV, WEEV, WNV und VacV) lagen um bis zu drei 10er-log-Stufen höher als im etablierten real-time-Nachweis. Exemplarisch wurde untersucht, ob die Amplifizierung des PCR-Produktes in der Kartusche in demselben Maße erfolgt wie in der rt PCR bzw. rt RT-PCR. Es zeigten sich in der Produktausbeute keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden molekularbiologischen Systemen (Abbildung 23).

Wie lassen sich die Unterschiede in den Nachweisgrenzen im AP[®]-System im Vergleich zur rt PCR bzw. rt RT-PCR erklären? Wie bereits unter 5.2.4.5.3 erwähnt, ergibt sich in der AP[®]-Kartusche eine Konkurrenzsituation bei der Hybridisierung des PCR-Produktes. Nach der Denaturierung kann der Fluoreszenz-gelabelte Einzelstrang des Amplikons sowohl an die spezifische immobilisierte Sonde als auch an den komplementären ungelabelten Einzelstrang in Lösung binden.

Eine weitere Konkurrenzsituation in der AP[®]-Kartusche ist dadurch bedingt, dass die Fängersonden in der Regel im Überschuss auf die epoxyaktivierte Biochip-Oberfläche aufgebracht werden. Sonden, welche direkt mit der aktivierten Oberfläche interagieren können, werden kovalent gebunden. Ungebundene und überschüssige Oligonukleotide des Spots gehen bei der Injektion des Reaktionsmixes in Lösung. Bei der Hybridisierungsreaktion stehen diese löslichen Oligonukleotide somit neben den immobilisierten Sonden für das in der PCR entstandene Amplikon zur spezifischen Bindung zur Verfügung. Das in Lösung gebundene PCR-Amplikon trägt folglich nicht mehr zur spezifischen Signalgenerierung an den immobilisierten Sonden bei. Eine Reduktion des spezifischen Signals trotz ausreichender Menge an gebildetem Amplikon ist die Folge.

Für das Alphavirus VEEV konnte im Zuge dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Stammunterscheidung durch die Auswahl passender Fängersonden innerhalb einer Virusspezies möglich ist. Alle drei VEEV IAB-Stämme (TC-83, TrD und H12/93) zeigten ein identisches Signalmuster und konnten von VEEV P676 (IC-Stamm) und VEEV 3880 (ID-Stamm) unterschieden werden. Virusstämme, welche nicht der antigenischen Gruppe I von VEEV angehörten (VEEV Fe3-7c – Gruppe II), zeigten mit den Sonden keine Kreuzreaktionen und wurden nicht detektiert (siehe 5.2.4.9).

Multiplex-Reaktionen von zwei bzw. drei verschiedenen Virusspezies wurden realisiert und führten zu positiven Ergebnissen. Dabei konnten folgende Duplexnachweise verwirklicht werden: die Identifizierung eines Alphavirus in zwei Strukturgenen und der Nachweis zweier Alphaviren im gleichen Gen bzw. in unterschiedlichen Strukturgenen (siehe 5.2.4.10.1).

Die molekularbiologische Identifizierung von drei Viren konnte sowohl für die Kombination ausschließlich aus RNA-Viren als auch als Kombination von DNA- und RNA-Viren gezeigt werden (siehe 5.2.4.10.2). Die Kombination des EEEV-Nachweises im E1- und E2-Gen mit der VacV-Detektion bzw. des EEEV_E1- und des YFV-Nachweises mit der VacV-Identifikation bereitete Schwierigkeiten, wobei derzeit über die Gründe der starken Signalreduktion nur spekuliert werden kann.

6.3 Vor- und Nachteile des immunologischen und molekularbiologischen Nachweises im AP[®]-System

Der grundsätzliche Vorteil des AP[®]-System besteht in der Tatsache, dass die Durchführung sowohl der immunologischen als auch der molekularbiologischen Nachweise nicht an voll ausgebildetes Fachpersonal gebunden ist, sondern auch von geschulten Bedienern ausgeführt werden kann. Des Weiteren existiert für den Experimentator nach der Injektion des Reaktionsmixes in die AP[®]-Kartusche keine weitere Gefahr einer Kontamination, da die gesamte Prozessierung der Nachweis-Reaktion bis zum Auslesen des Ergebnisses ohne weiteres Eingreifen des Bedieners in der gekapselten Kammer abläuft.

Dieser Fakt stellt eine beträchtliche Einschränkung und Schwierigkeit für die Etablierung und Optimierung immunologischer Nachweise von Viren, Bakterien und Toxinen, welche auf einen Sandwich-ELISA ohne Waschschrte basieren, dar. Durch das Prinzip der „Ein-Topf-Reaktion“ ist es erforderlich, die Konzentration des Nachweis-Antikörpers auf die 10- bis 100-fache Menge standardmäßig durchgeführter immunologischer Nachweise wie AT-System und ELISA zu erhöhen. Dies führt zusammen mit der zeitgleichen Inkubation aller Reaktionsbestandteile ohne trennende Waschschrte dazu, dass es teilweise zu massiven Kreuzreaktionen mit anderen Fänger-Antikörpern kam. Stehen für die Optimierung der verschiedenen Nachweise keine weiteren spezifischen Antikörper-Paare zur Verfügung, ist man darauf angewiesen, die Kreuzreaktionen durch weitere Anpassungen z.B. durch Blockingreagenzien und die Verminderung der NW-Ak-Konzentration zu reduzieren. Diese Erhöhung der Spezifität erfolgt dabei meist auf Kosten der Sensitivität.

Obwohl jeder einzelne immunologische Virusnachweis hinsichtlich seiner optimalen Pufferbedingungen und der NW-Ak-Konzentration untersucht wurde, gelang es zum Teil nicht, einzelne bereits im ELISA etablierte Fänger- und Nachweis-Antikörper-Paare für den Nachweis im AP[®]-System zu übernehmen. Der Nachweis verschiedener Flaviviren gelang trotz mehrfacher Anpassung der Nachweis-Moleküle nicht. Die Detektionsgrenzen des immunologischen AP[®]-Nachweises lagen im Allgemeinen eine log₁₀-Stufe über denen von AT- und ELISA-Nachweisen. Dies ist dem ungewohnten Nachweisprinzip in Form der „Ein-Topf-Reaktion“ und der Prozessierungszeit von 30 min geschuldet. Für die Alphaviren liegt die

standardmäßige Bearbeitungszeit für den ELISA-Nachweis bei drei bis sechs Stunden, im AP[®]-System beträgt die Zeitersparnis daher bis zu 90 % bei einer Prozessierungszeit von 30 Minuten. Damit liegt eine immunologische Identifikation im AP[®]-System zeitlich innerhalb der Bearbeitungszeit eines Lateral Flow Assays und erfüllt mit den ermittelten spezifischen Nachweisgrenzen die Anforderungen an ein schnelles Biotektor-System.

Der molekularbiologische Nachweis auf Basis von immobilisierten Oligonukleotiden auf einer Biochip-Oberfläche erlaubt durch eine exakte und gut durchdachte Auswahl an Hybridisierungssonden die spezifische Identifikation verschiedenster Nukleinsäure-haltiger Organismen ohne Kreuzreaktionen mit unspezifischen Sonden. Der Parallelnachweis verschiedener Viren ist laut Daten auf maximal drei Amplikons beschränkt. Durch die hohe Konzentration an Primern (bei drei Primerpaaren in der Kartusche ergibt sich darin eine Konzentration von 1,8 μM) kommt es zu Beeinträchtigungen zwischen den Nachweisen. Diese Inhibition tritt ebenfalls bei der Kombination von drei Nachweisen in der rt RT-PCR auf (HÜLSEWEH, B. (2009), persönliche Mitteilung) und ist somit nicht allein auf den Biochip-Nachweis begrenzt. Im Vergleich zum klassischen molekularbiologischen Nachweis mittels real-time RT-PCR ergibt sich für den AP[®]-Nachweis nur eine geringe Zeitersparnis. Die Nachweisgrenzen liegen eine bis drei \log_{10} -Stufen über denen der rt RT-PCR. Dieses Defizit ließe sich jedoch durch eine geringe Modifikation an der Kartusche überwinden: da die spezifische Amplifikation an PCR-Produkt in der Kartusche mit der in einem PCR-Cycler vergleichbar ist (siehe Abbildung 23), könnte eine Förderung der Hybridisierung durch Erhöhung der Salzkonzentration im Puffer die Nachweisgrenzen deutlich verbessern. SSC-Puffer könnte z.B. nach der PCR über einen Dorn mechanisch in die Reaktionskammer injiziert werden. Experimentell wurde dies bereits durch die Injektion von SSC-Puffer nach erfolgter PCR und vor der Hybridisierung in die AP[®]-Kartusche nachgewiesen (siehe Abbildung 24).

Im Gegensatz zum immunologischen Virusnachweis können die molekularbiologischen Nachweis-Reaktionen, welche in der real-time RT-PCR bzw. PCR optimiert wurden, eins-zu-eins auf das AP[®]-System übertragen werden. Die PCR-Produktmengen in der Standard-PCR und im AP[®]-System sind miteinander vergleichbar (siehe Abbildung 23).

Mit einer gezielten Auswahl der Hybridisierungssonden kann nicht nur ein speziesspezifischer Nachweis von Viren und anderen Mikroorganismen durchgeführt werden. Diese Spezifität erlaubt eine molekularbiologische Identifizierung von Virusspezies und -stämmen anhand eines für jedes Virus eindeutigen Signalmusters auf dem AP[®]-Biochip. Der immunologische Biochip-Nachweis erlaubt – wie alle anderen Antikörper-basierten Analysemethoden wie z.B. ELISA – bestenfalls nur eine speziesspezifische Identifikation der Viren.

Prinzipiell lassen sich mit einem molekularbiologischen Nachweissystem jedoch nur Organismen nachweisen, welche über genetisches Material verfügen. Somit können BWA-relevante Toxine mangels eigener Nukleinsäure nicht identifiziert werden.

Ein generelles Problem der immunologischen und molekularbiologischen Nachweise in der AP[®]-Kartusche liegt in dem Fakt begründet, dass spezifische Nachweisgrenzen für die Alpha-, Flavi- und Orthopockenviren derzeit noch über der infektiösen Dosis der Organismen liegen. Dies bedeutet, dass in der untersuchten und im Nachweis für negativ befundenen Probe, durchaus Virusmengen, welche für eine Infektion ausreichen, vorhanden sein könnten. Dieser Sachverhalt und Kritikpunkt betrifft jedoch nicht nur das AP[®]-System. Die Nachweisgrenzen fast aller biologischer Detektionssysteme liegen derzeit deutlich über der infektiösen Dosis.

6.4 Vorschlag eines Biochip-Layouts zur immunologischen bzw. molekularbiologischen Identifikation von BWA-relevanten Viren

Das vorgeschlagene Biochip-Layout zur immunologischen Identifikation umfasst die Nachweise für Ricin und der Alpha- und Orthopockenviren. Die bisher etablierte Positivkontrolle *E.coli* könnte weiterhin in einer separaten Kartusche prozessiert werden. Ist eine gleichzeitige Prozessierung der Positivkontrolle mit Toxin- und/oder Virusnachweisen gewünscht, müsste eine im Parallelnachweis signalstabile Alternative gefunden werden.

o		3	3			6	6		o
o		3	3			6	6		
				7	7				o
				7	7				o
o		8	8			11	11		
		8	8			11	11		o
									o
o		19	19			22	22		
o		19	19			22	22		o

Nr.	Code	Antigen
3	R2	Ricin
6	AF	Ricin
7	P1	Alternative zur Positivkontrolle <i>E. coli</i>
8	O100	OPV
11	O100/O101	OPV
19	V100	VEEV
22	V-Mix	VEEV, WEEV, EEEV, CHIKV

Abbildung 51: Endgültiges Array-Layout für die immunologische Identifikation von Ricin, Alpha- und Orthopockenviren

Die gelb unterlegten Spots stellen Fänger-Antikörper und -Moleküle für Ricin und die grün unterlegten eine Alternative für die Positivkontrolle dar. Die blau gekennzeichneten Spots zeigen die Fänger-Antikörper für die Identifikation der Alpha- und Orthopockenviren. Sowohl für Ricin als auch für die beiden Virusgenera sind jeweils 2 Fänger-Moleküle in 4-facher Wiederholung auf dem Biochip immobilisiert.

Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente für die molekularbiologische Identifikation von BWA-relevanten Viren wurde das Layout eines potentiellen viralen DNA-AP®-Chips entwickelt. Die optimierten Hybridisierungssonden sind in Clustern angeordnet. Mit Ausnahme des VEEV_E1-Nachweises erfolgt die Identifikation der Alpha-, Flavi- und Orthopockenviren mit Consensus-Sonden. Verschiedene VEEV-Stämme können weiterhin durch spezifische Fängersonden auf dem Biochip in die antigenischen Gruppen IAB, IC oder ID eingeordnet werden.

o		4	4		1	1		2	2		o
		3	3		5	5		7	7		o
					6	6					o
o		10	10					14	14		
o		12	12		28	28		15	15		
o					31	31					
o		21	21					34	34		
o		24	24		36	36		35	35		
					40	40					o
		43	43		42	42		48	48		o
o		44	44					50	50		o

Nr.	Code	spezifisch für
1	E1_V1	VEEV Stamm V198 (IC)
2	E1_V2	VEEV Stamm 3880 (ID)
3	E1_cons_iab_ic_id	Consensus VEEV
4	E1_V3_1	VEEV Stamm TC-83 (IAB)
5	E1_V4	VEEV Stamm SH3 (IC)
6	cons_veev_ic_E1	Consensus VEEV_IC
7	cons_veev_id_E1	Consensus VEEV_ID
10	cons_weev_E1_n3	Consensus WEEV
12	E1_cons_weev_n1	Consensus WEEV
14	EEEV_F1	EEEV
15	EEEV_F2	EEEV
21	cons_veev_iab_E2	Consensus VEEV
24	cons_veev_iab_ic_id_E2	Consensus VEEV
28	E2_cons_weev	Consensus WEEV
31	cons_weev_E2_n2	Consensus WEEV
34	EEEV_F8	EEEV
35	EEEV_F9	EEEV
36	Pox_F1	OPV
40	Pox_F5	OPV
42	Pox_F7	OPV
43	YFP_neu	YFV
44	YFP_neu2	YFV
48	WNV_F3	WNV
50	WNV_F5	WNV

Abbildung 52: Endgültiges Array-Layout für die molekularbiologische Identifikation von Alpha-, Flavi- und Orthopockenviren

Die gelb und orange unterlegten Spots stellen Hybridisierungssonden für den Nachweis von Alphaviren im E1-Gen dar. Dabei können verschiedene VEEV-Stämme mit Hilfe stammspezifischer und Consensus-Sonden voneinander unterschieden werden (Sonde 1 bis 7). Die Identifikation von WEEV (Sonde 10 und 12) bzw. EEEV (Sonde 14 und 15) erfolgt mit stammübergreifenden Fängersonden. Die Detektion der Alphaviren im E2-Gen erfolgt für alle drei Virusspezies über Consensus-Sonden (VEEV: Sonde 21 und 24; WEEV: Sonde 28 und 31; EEEV: Sonde 34 und 35). Der molekularbiologische Nachweis der Flaviviren WNV (Sonde 43 und 44) und YFV (Sonde 48 und 50) erfolgt mit je zwei Oligonukleotidsonden. Neben zwei Consensus-Sonden für die Detektion von Orthopocken (Sonde 36 und 40), kann das Variola-Virus spezifisch mit Sonde 42 nachgewiesen werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Weaver SC: **Evolutionary influences in arboviral disease.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2006, **299**: 285-314.
2. Hubalek Z: **Mosquito-borne viruses in Europe.** *Parasitol Res* 2008, **103 Suppl 1**: S29-S43.
3. Calisher CH: **Medically important arboviruses of the United States and Canada.** *Clin Microbiol Rev* 1994, **7**: 89-116.
4. Havens WP, Watson DW, Green RH, Lavin GI, Smadel JE: **Complement fixation with the neurotropic viruses.** *J Exp Med* 1943, **77**: 139-153.
5. Casals J, Brown LV: **Hemagglutination with arthropod-borne viruses.** *J Exp Med* 1954, **99**: 429-449.
6. Clarke DH, Casals J: **Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses.** *Am J Trop Med Hyg* 1958, **7**: 561-573.
7. Casals J: **Relationships among arthropod-borne animal viruses determined by cross-challenge tests.** *Am J Trop Med Hyg* 1963, **12**: 587-596.
8. Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich SY, Horzinek MC, Igarashi A, Kaariainen L *et al.*: **Togaviridae.** *Intervirology* 1985, **24**: 125-139.
9. Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich SY, Horzinek MC, Igarashi A, Kaariainen L *et al.*: **Flaviviridae.** *Intervirology* 1985, **24**: 183-192.
10. Calisher CH, Shope RE, Brandt W, Casals J, Karabatsos N, Murphy FA *et al.*: **Proposed antigenic classification of registered arboviruses I. Togaviridae, Alphavirus.** *Intervirology* 1980, **14**: 229-232.
11. Houk EJ, Kramer LD, Hardy JL, Presser SB: **An interspecific mosquito model for the mesenteron infection barrier to western equine encephalomyelitis virus (*Culex tarsalis* and *Culex pipiens*).** *Am J Trop Med Hyg* 1986, **35**: 632-641.
12. Kramer LD, Hardy JL, Presser SB, Houk EJ: **Dissemination barriers for western equine encephalomyelitis virus in *Culex tarsalis* infected after ingestion of low viral doses.** *Am J Trop Med Hyg* 1981, **30**: 190-197.
13. Smith JP, Loyless TM, Mulrennan JA, Jr.: **An update on *Aedes albopictus* in Florida.** *J Am Mosq Control Assoc* 1990, **6**: 318-320.
14. Strauss JH, Strauss EG: **The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution.** *Microbiol Rev* 1994, **58**: 491-562.
15. Calisher CH, Karabatsos N: **Arbovirus serogroups: definition and geographic distribution.** In *The arboviruses: epidemiology and ecology Vol. I.* Edited by T.P.Monath. Boca Raton, Fla.: CRC Press, Inc.; 1988:19-57.

16. Levinson RS, Strauss JH, Strauss EG: **Complete sequence of the genomic RNA of O'nyong-nyong virus and its use in the construction of alphavirus phylogenetic trees.** *Virology* 1990, **175**: 110-123.
17. Weaver SC, Hagenbaugh A, Bellew LA, Netesov SV, Volchkov VE, Chang GJ *et al.*: **A comparison of the nucleotide sequences of eastern and western equine encephalomyelitis viruses with those of other alphaviruses and related RNA viruses.** *Virology* 1993, **197**: 375-390.
18. Powers AM, Brault AC, Shirako Y, Strauss EG, Kang W, Strauss JH *et al.*: **Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses.** *J Virol* 2001, **75**: 10118-10131.
19. Russell RC: **Vectors vs. humans in Australia--who is on top down under? An update on vector-borne disease and research on vectors in Australia.** *J Vector Ecol* 1998, **23**: 1-46.
20. Poidinger M, Roy S, Hall RA, Turley PJ, Scherret JH, Lindsay MD *et al.*: **Genetic stability among temporally and geographically diverse isolates of Barmah Forest virus.** *Am J Trop Med Hyg* 1997, **57**: 230-234.
21. Zacks MA, Paessler S: **Encephalitic alphaviruses.** *Vet Microbiol* 2009.
22. Luers AJ, Adams SD, Smalley JV, Campanella JJ: **A phylogenomic study of the genus alphavirus employing whole genome comparison.** *Comp Funct Genomics* 2005, **6**: 217-227.
23. Nagata LP, Hu WG, Parker M, Chau D, Rayner GA, Schmaltz FL *et al.*: **Infectivity variation and genetic diversity among strains of Western equine encephalitis virus.** *J Gen Virol* 2006, **87**: 2353-2361.
24. Calisher CH, Karabatsos N, Lazuick JS, Monath TP, Wolff KL: **Reevaluation of the western equine encephalitis antigenic complex of alphaviruses (family Togaviridae) as determined by neutralization tests.** *Am J Trop Med Hyg* 1988, **38**: 447-452.
25. Weaver SC, Dalgarno L, Frey T.K., Huang H.V., Kinney RM: **Family Togaviridae.** In *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Edited by MHV van Regenmortel, CM Fauquet, DHL Bishop, EB Carstens, MK Estes *et al.* San Diego: Academic; 1992:879-889.
26. Weaver SC, Ferro C, Barrera R, Boshell J, Navarro JC: **Venezuelan equine encephalitis.** *Annu Rev Entomol* 2004, **49**: 141-174.
27. Hahn CS, Lustig S, Strauss EG, Strauss JH: **Western equine encephalitis virus is a recombinant virus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, **85**: 5997-6001.
28. Weaver SC, Kang W, Shirako Y, Rumenapf T, Strauss EG, Strauss JH: **Recombinational history and molecular evolution of western equine encephalomyelitis complex alphaviruses.** *J Virol* 1997, **71**: 613-623.
29. Paredes AM, Brown DT, Rothnagel R, Chiu W, Schoepp RJ, Johnston RE *et al.*: **Three-dimensional structure of a membrane-containing virus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**: 9095-9099.

30. Paredes A, Alwell-Warda K, Weaver SC, Chiu W, Watowich SJ: **Venezuelan equine encephalomyelitis virus structure and its divergence from old world alphaviruses.** *J Virol* 2001, **75**: 9532-9537.
31. Kinney RM, Chang GJ, Tsuchiya KR, Sneider JM, Roehrig JT, Woodward TM *et al.*: **Attenuation of Venezuelan equine encephalitis virus strain TC-83 is encoded by the 5'-noncoding region and the E2 envelope glycoprotein.** *J Virol* 1993, **67**: 1269-1277.
32. France JK, Wyrick BC, Trent DW: **Biochemical and antigenic comparison of the envelope glycoproteins of Venezuelan equine encephalomyelitis virus strains.** *J Gen Virol* 1979, **44**: 725-740.
33. Kinney RM, Tsuchiya KR, Sneider JM, Trent DW: **Molecular evidence for the origin of the widespread Venezuelan equine encephalitis epizootic of 1969 to 1972.** *J Gen Virol* 1992, **73** (Pt 12): 3301-3305.
34. Kinney RM, Johnson BJ, Welch JB, Tsuchiya KR, Trent DW: **The full-length nucleotide sequences of the virulent Trinidad donkey strain of Venezuelan equine encephalitis virus and its attenuated vaccine derivative, strain TC-83.** *Virology* 1989, **170**: 19-30.
35. Strauss EG, Strauss JH: **Structure and replication of the alphavirus genome.** In *The Togaviridae and Flaviviridae*. Edited by S.Schlesinger, M.J.Schlesinger. New York: Plenum Publishing Corp.; 1986:35-90.
36. Albornos J.E.: **La peste loca de las bestias (Enfermedad de Borna).** *Min Agr Com Bogota* 1935, **26**: 1-8.
37. Beck CE, Wyckoff RW: **Venezuelan equine encephalomyelitis.** *Science* 1938, **88**: 530.
38. Kubes V, Rios FA: **Equine Encephalomyelitis in Venezuela: Advance Data Concerning the Causative Agent.** *Can J Comp Med* 1939, **3**: 43-44.
39. Kubes V, Rios FA: **The causative agent of infectious equine encephalomyelitis in Venezuela.** *Science* 1939, **90**: 20-21.
40. Casals J, Curnen EC, Thomas L: **Venezuelan equine encephalomyelitis in man.** *J Exp Med* 1943, **77**: 521-530.
41. Wang E, Paessler S, Aguilar PV, Smith DR, Coffey LL, Kang W *et al.*: **A novel, rapid assay for detection and differentiation of serotype-specific antibodies to Venezuelan equine encephalitis complex alphaviruses.** *Am J Trop Med Hyg* 2005, **72**: 805-810.
42. Deardorff ER, Forrester NL, Travassos-da-Rosa AP, Estrada-Franco JG, Navarro-Lopez R, Tesh RB *et al.*: **Experimental infection of potential reservoir hosts with Venezuelan equine encephalitis virus, Mexico.** *Emerg Infect Dis* 2009, **15**: 519-525.
43. Bronze MS, Huycke MM, Machado LJ, Voskuhl GW, Greenfield RA: **Viral agents as biological weapons and agents of bioterrorism.** *Am J Med Sci* 2002, **323**: 316-325.
44. U.S.Department of Health and Human Services: **Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.** *U S Government Printing Office* 1999, **Fourth Edition**.

45. Hawley RJ, Eitzen EM, Jr.: **Biological weapons--a primer for microbiologists.** *Annu Rev Microbiol* 2001, **55**: 235-253.
46. Leon CA: **Sequelae of Venezuelan equine encephalitis in humans: a four year follow-up.** *Int J Epidemiol* 1975, **4**: 131-140.
47. Johnson KM, Martin DH: **Venezuelan equine encephalitis.** *Adv Vet Sci Comp Med* 1974, **18**: 79-116.
48. Walton TE, Grayson M.A.: **Venezuelan equine encephalomyelitis.** In *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology; Vol. IV.* Edited by T.P.Monath. Boca Raton, FL.: CRC Press; 1973:203-231.
49. McKinney RW, Berge TO, Sawyer WD, Tigertt WD, Crozier D: **Use of attenuated strain of Venezuelan equine encephalomyelitis virus for immunization in man.** *Am J Trop Med Hyg* 1963, **12**: 597-603.
50. Calisher CH, Maness KC: **Virulence of Venezuelan equine encephalomyelitis virus subtypes for various laboratory hosts.** *Appl Microbiol* 1974, **28**: 881-884.
51. Berge TO, Banks I.S., Tigertt WD: **Attenuation of Venezuelan Equine Encephalitis Virus by in vitro cultivation in guinea pig heart cells.** *Am J Hyg* 1961, **73**: 209-218.
52. Gleiser CA, Gochenour WSJ, Berge TO, Tigertt WD: **The comparative pathology of experimental Venezuelan equine encephalomyelitis infection in different animal hosts.** *J Infect Dis* 1962, **110**: 80-97.
53. Kinney RM, Esposito JJ, Mathews JH, Johnson BJ, Roehrig JT, Barrett AD *et al.*: **Recombinant vaccinia virus/Venezuelan equine encephalitis (VEE) virus protects mice from peripheral VEE virus challenge.** *J Virol* 1988, **62**: 4697-4702.
54. Mathews JH, Roehrig JT: **Determination of the protective epitopes on the glycoproteins of Venezuelan equine encephalomyelitis virus by passive transfer of monoclonal antibodies.** *J Immunol* 1982, **129**: 2763-2767.
55. Ludwig GV, Turell MJ, Vogel P, Kondig JP, Kell WK, Smith JF *et al.*: **Comparative neurovirulence of attenuated and non-attenuated strains of Venezuelan equine encephalitis virus in mice.** *Am J Trop Med Hyg* 2001, **64**: 49-55.
56. Casals J: **Antigenic variants of Eastern equine encephalitis virus.** *J Exp Med* 1964, **119**: 547-565.
57. Roehrig JT, Bolin RA, Hunt AR, Woodward TM: **Use of a new synthetic-peptide-derived monoclonal antibody to differentiate between vaccine and wild-type Venezuelan equine encephalomyelitis viruses.** *J Clin Microbiol* 1991, **29**: 630-631.
58. Young NA, Johnson KM: **Antigenic variants of Venezuelan equine encephalitis virus: their geographic distribution and epidemiologic significance.** *Am J Epidemiol* 1969, **89**: 286-307.
59. Kinney RM, Trent DW, France JK: **Comparative immunological and biochemical analyses of viruses in the Venezuelan equine encephalitis complex.** *J Gen Virol* 1983, **64 (Pt 1)**: 135-147.

60. Calisher CH, Kinney RM, de Souza LO, Trent DW, Monath TP, Francys DB: **Identification of a new Venezuelan equine encephalitis virus from Brazil.** *Am J Trop Med Hyg* 1982, **31**: 1260-1272.
61. Calisher CH, Monath TP, Mitchell CJ, Sabattini MS, Cropp CB, Kerschner J *et al.*: **Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. III. Identification and characterization of viruses isolated, including new subtypes of western and Venezuelan equine encephalitis viruses and four new bunyaviruses (Las Maloyas, Resistencia, Barranqueras, and Antequera).** *Am J Trop Med Hyg* 1985, **34**: 956-965.
62. Meissner JD, Huang CY, Pfeffer M, Kinney RM: **Sequencing of prototype viruses in the Venezuelan equine encephalitis antigenic complex.** *Virus Res* 1999, **64**: 43-59.
63. Scherer WF, Pancake BA: **Comparisons of Venezuelan encephalitis virus strains by hemagglutination-inhibition tests with chicken antibodies.** *J Clin Microbiol* 1977, **6**: 578-585.
64. Pedersen CE, Jr., Eddy GA: **Comparative analyses of members of the Venezuelan equine encephalomyelitis virus complex.** *Am J Epidemiol* 1975, **101**: 245-252.
65. Walder R, Bradish CJ: **Venezuelan equine encephalomyelitis virus (VEEV): strain differentiation and specification of virulence markers.** *J Gen Virol* 1975, **26**: 265-275.
66. Weaver SC, Anishchenko M, Bowen R, Brault AC, Estrada-Franco JG, Fernandez Z *et al.*: **Genetic determinants of Venezuelan equine encephalitis emergence.** *Arch Virol Suppl* 2004, 43-64.
67. Wiebe ME, Scherer WF: **Virion envelope glycoproteins as epidemiological markers of Venezuelan encephalitis virus isolates.** *J Clin Microbiol* 1980, **11**: 349-354.
68. Shope RE, Causey OR, de Andrade AH: **The Venezuelan equine encephalomyelitis complex of group A arthropod-borne viruses, including Mucambo and Pixuna from the Amazon region of Brazil.** *Am J Trop Med Hyg* 1964, **13**: 723-727.
69. Zarate ML, Scherer WF: **A comparative study of virulences, plaque morphologies and antigenic characteristics of Venezuelan encephalitis virus strains.** *Am J Epidemiol* 1969, **89**: 489-502.
70. Walton TE, Alvarez O, Jr., Buckwalter RM, Johnson KM: **Experimental infection of horses with enzootic and epizootic strains of Venezuelan equine encephalomyelitis virus.** *J Infect Dis* 1973, **128**: 271-282.
71. Franck PT, Johnson KM: **An outbreak of Venezuelan equine encephalomyelitis in Central America. Evidence for exogenous source of a virulent virus subtype.** *Am J Epidemiol* 1971, **94**: 487-495.
72. Young NA, Johnson KM: **Viruses of the Venezuelan equine encephalomyelitis complex. Infection and cross-challenge of rodents with VEE, Mucambo, and Pixuna viruses.** *Am J Trop Med Hyg* 1969, **18**: 280-289.
73. Gonzalez-Salazar D, Estrada-Franco JG, Carrara AS, Aronson JF, Weaver SC: **Equine amplification and virulence of subtype IE Venezuelan equine encephalitis viruses**

- isolated during the 1993 and 1996 Mexican epizootics. *Emerg Infect Dis* 2003, **9**: 161-168.
74. Lord RD: **History and geographic distribution of Venezuelan equine encephalitis.** *Bull Pan Am Health Organ* 1974, **8**: 100-110.
75. Weaver SC: **Venezuelan Equine Encephalitis.** In Service MW. *The encyclopedia of arthropod-transmitted infections.* Wallingford, UK: CAB International; 2001:539-548.
76. Wang E, Bowen RA, Medina G, Powers AM, Kang W, Chandler LM *et al.*: **Virulence and viremia characteristics of 1992 epizootic subtype IC Venezuelan equine encephalitis viruses and closely related enzootic subtype ID strains.** *Am J Trop Med Hyg* 2001, **65**: 64-69.
77. Martin DH, Dietz WH, Alvaerez O, Jr., Johnson KM: **Epidemiological significance of Venezuelan equine encephalomyelitis virus in vitro markers.** *Am J Trop Med Hyg* 1982, **31**: 561-568.
78. Garman JL, Scherer WF, Dickerman RW: **A study of equine virulence of naturally occurring Venezuelan encephalitis virus in Veracruz with description of antibody responses.** *Bol Oficina Sanit Panam* 1968, **65**: 238-252.
79. Gardner CL, Burke CW, Tesfay MZ, Glass PJ, Klimstra WB, Ryman KD: **Eastern and Venezuelan equine encephalitis viruses differ in their ability to infect dendritic cells and macrophages: impact of altered cell tropism on pathogenesis.** *J Virol* 2008, **82**: 10634-10646.
80. Johnson KM, Shelokov A, Peralta PH, Dammin GJ, Young NA: **Recovery of Venezuelan equine encephalomyelitis virus in Panama. A fatal case in man.** *Am J Trop Med Hyg* 1968, **17**: 432-440.
81. Zarate ML, Scherer WF, Dickerman RW: **Venezuelan equine encephalitis virus as a human infection determinant. Description of a fatal case occurring in Jaltipan, Ver., in 1965.** *Rev Invest Salud Publica* 1970, **30**: 296-302.
82. Kinney RM, Tsuchiya KR, Sneider JM, Trent DW: **Genetic evidence that epizootic Venezuelan equine encephalitis (VEE) viruses may have evolved from enzootic VEE subtype I-D virus.** *Virology* 1992, **191**: 569-580.
83. Rico-Hesse R, Roehrig JT, Trent DW, Dickerman RW: **Genetic variation of Venezuelan equine encephalitis virus strains of the ID variety in Colombia.** *Am J Trop Med Hyg* 1988, **38**: 195-204.
84. Brault AC, Powers AM, Ortiz D, Estrada-Franco JG, Navarro-Lopez R, Weaver SC: **Venezuelan equine encephalitis emergence: enhanced vector infection from a single amino acid substitution in the envelope glycoprotein.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**: 11344-11349.
85. Modrow S.: *Molekulare Virologie, 2. Edition.* 2003.
86. Theiler M, Smith HH: **The effect of prolonged cultivation in vitro upon the pathogenicity of Yellow Fever Virus.** *J Exp Med* 1937, **65**: 767-786.
87. Fenner F, Burnet FM: **A short description of the poxvirus group (vaccinia and related viruses).** *Virology* 1957, **4**: 305-314.

88. Buller RM, Palumbo GJ: **Poxvirus pathogenesis.** *Microbiol Rev* 1991, **55**: 80-122.
89. Belongia EA, Naleway AL: **Smallpox vaccine: the good, the bad, and the ugly.** *Clin Med Res* 2003, **1**: 87-92.
90. Fenner F, Henderson DA, Arita I, Jezek Z, Ladnyi ID: **Smallpox and its eradication.** *World Health Organization, Communicable Disease Surveilla* 1988.
91. Connor JD, McIntosh K, Cherry JD, Benenson AS, Alling DW, Rolfe UT *et al.*: **Clinical and serologic study of four smallpox vaccines comparing variations of dose and route of administration. Primary subcutaneous vaccination.** *J Infect Dis* 1977, **135**: 167-175.
92. Fenner F: **A successful eradication campaign. Global eradication of smallpox.** *Rev Infect Dis* 1982, **4**: 916-930.
93. Aragon TJ, Ulrich S, Fernyak S, Rutherford GW: **Risks of serious complications and death from smallpox vaccination: a systematic review of the United States experience, 1963-1968.** *BMC Public Health* 2003, **3**: 26.
94. Essani K, Dales S: **Biogenesis of vaccinia: evidence for more than 100 polypeptides in the virion.** *Virology* 1979, **95**: 385-394.
95. Oie M, Ichihashi Y: **Characterization of vaccinia polypeptides.** *Virology* 1981, **113**: 263-276.
96. Sarov I, Joklik WK: **Studies on the nature and location of the capsid polypeptides of vaccinia virions.** *Virology* 1972, **50**: 579-592.
97. Hirt P, Hiller G, Wittek R: **Localization and fine structure of a vaccinia virus gene encoding an envelope antigen.** *J Virol* 1986, **58**: 757-764.
98. Payne L: **Polypeptide composition of extracellular enveloped vaccinia virus.** *J Virol* 1978, **27**: 28-37.
99. Payne LG: **Identification of the vaccinia hemagglutinin polypeptide from a cell system yielding large amounts of extracellular enveloped virus.** *J Virol* 1979, **31**: 147-155.
100. Johnson GP, Goebel SJ, Paoletti E: **An update on the vaccinia virus genome.** *Virology* 1993, **196**: 381-401.
101. Perdiguero B, Esteban M: **The interferon system and vaccinia virus evasion mechanisms.** *J Interferon Cytokine Res* 2009, **29**: 581-598.
102. Mann BA, Huang JH, Li P, Chang HC, Slee RB, O'Sullivan A *et al.*: **Vaccinia virus blocks Stat1-dependent and Stat1-independent gene expression induced by type I and type II interferons.** *J Interferon Cytokine Res* 2008, **28**: 367-380.
103. Dasgupta A, Hammarlund E, Slifka MK, Fruh K: **Cowpox virus evades CTL recognition and inhibits the intracellular transport of MHC class I molecules.** *J Immunol* 2007, **178**: 1654-1661.

104. Lodes MJ, Suci D, Wilmoth JL, Ross M, Munro S, Dix K *et al.*: **Identification of upper respiratory tract pathogens using electrochemical detection on an oligonucleotide microarray.** *PLoS One* 2007, **2**: e924.
105. Stenger DA, Andreadis JD, Vora GJ, Pancrazio JJ: **Potential applications of DNA microarrays in biodefense-related diagnostics.** *Curr Opin Biotechnol* 2002, **13**: 208-212.
106. Jungkind D: **Tech.Sight. Molecular testing for infectious disease.** *Science* 2001, **294**: 1553-1555.
107. Wheelan SJ, Martinez MF, Boeke JD: **The incredible shrinking world of DNA microarrays.** *Mol Biosyst* 2008, **4**: 726-732.
108. Yeung SW, Lee TM, Cai H, Hsing IM: **A DNA biochip for on-the-spot multiplexed pathogen identification.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**: e118.
109. Mikhailovich V, Gryadunov D, Kolchinsky A, Makarov AA, Zasedatelev A: **DNA microarrays in the clinic: infectious diseases.** *Bioessays* 2008, **30**: 673-682.
110. Wang D, Coscoy L, Zylberberg M, Avila PC, Boushey HA, Ganem D *et al.*: **Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**: 15687-15692.
111. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE: **Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology.** *Clin Microbiol Rev* 2000, **13**: 559-570.
112. Andreadis JD, Mann TT, Russell AC, Stenger DA, Pancrazio JJ: **Identification of differential gene expression profiles in rat cortical cells exposed to the neuroactive agents trimethylolpropane phosphate and bicuculline.** *Biosens Bioelectron* 2001, **16**: 593-601.
113. Dodson JM, Charles PT, Stenger DA, Pancrazio JJ: **Quantitative assessment of filter-based cDNA microarrays: gene expression profiles of human T-lymphoma cell lines.** *Bioinformatics* 2002, **18**: 953-960.
114. Southern EM: **Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.** *J Mol Biol* 1975, **98**: 503-517.
115. Heidelberger M, Kendall FE: **A quantitative study of the Precipitin reaction between type II Pneumococcus polysaccharide and purified homologous antibody.** *J Exp Med* 1929, **50**: 809-823.
116. Bains W, Smith GC: **A novel method for nucleic acid sequence determination.** *J Theor Biol* 1988, **135**: 303-307.
117. Drmanac R, Labat I, Brukner I, Crkvenjakov R: **Sequencing of megabase plus DNA by hybridization: theory of the method.** *Genomics* 1989, **4**: 114-128.
118. Engvall E, Perlmann P: **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.** *Immunochemistry* 1971, **8**: 871-874.
119. Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D: **Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis.** *Science* 1991, **251**: 767-773.

120. Kohler G, Milstein C: **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.** *Nature* 1975, **256**: 495-497.
121. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO: **Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray.** *Science* 1995, **270**: 467-470.
122. Ekins R, Chu F, Biggart E: **Multispot, multianalyte, immunoassay.** *Ann Biol Clin (Paris)* 1990, **48**: 655-666.
123. DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M *et al.*: **Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer.** *Nat Genet* 1996, **14**: 457-460.
124. Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JC *et al.*: **The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum.** *Science* 1999, **283**: 83-87.
125. Silzel JW, Cercek B, Dodson C, Tsay T, Obremski RJ: **Mass-sensing, multianalyte microarray immunoassay with imaging detection.** *Clin Chem* 1998, **44**: 2036-2043.
126. Forozan F, Mahlamaki EH, Monni O, Chen Y, Veldman R, Jiang Y *et al.*: **Comparative genomic hybridization analysis of 38 breast cancer cell lines: a basis for interpreting complementary DNA microarray data.** *Cancer Res* 2000, **60**: 4519-4525.
127. Fritz B, Schubert F, Wrobel G, Schwaenen C, Wessendorf S, Nessling M *et al.*: **Microarray-based copy number and expression profiling in dedifferentiated and pleomorphic liposarcoma.** *Cancer Res* 2002, **62**: 2993-2998.
128. Mendoza LG, McQuary P, Mongan A, Gangadharan R, Brignac S, Eggers M: **High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).** *Biotechniques* 1999, **27**: 778-6, 788.
129. Achary MP, Jaggernauth W, Gross E, Alfieri A, Klinger HP, Vikram B: **Cell lines from the same cervical carcinoma but with different radiosensitivities exhibit different cDNA microarray patterns of gene expression.** *Cytogenet Cell Genet* 2000, **91**: 39-43.
130. Konstantinopoulos PA, Fountzilas E, Goldsmith JD, Bhasin M, Pillay K, Francoeur N *et al.*: **Analysis of multiple sarcoma expression datasets: implications for classification, oncogenic pathway activation and chemotherapy resistance.** *PLoS One* 2010, **5**: e9747.
131. Moody MD, Van Arsdel SW, Murphy KP, Orencole SF, Burns C: **Array-based ELISAs for high-throughput analysis of human cytokines.** *Biotechniques* 2001, **31**: 186-4.
132. Ivnitski D, O'Neil DJ, Gattuso A, Schlicht R, Calidonna M, Fisher R: **Nucleic acid approaches for detection and identification of biological warfare and infectious disease agents.** *Biotechniques* 2003, **35**: 862-869.
133. Huang RP, Huang R, Fan Y, Lin Y: **Simultaneous detection of multiple cytokines from conditioned media and patient's sera by an antibody-based protein array system.** *Anal Biochem* 2001, **294**: 55-62.

134. Mukhopadhyay R, Yu W, Whitehead J, Xu J, Lezcano M, Pack S *et al.*: **The binding sites for the chromatin insulator protein CTCF map to DNA methylation-free domains genome-wide.** *Genome Res* 2004, **14**: 1594-1602.
135. Lee KB, Park SJ, Mirkin CA, Smith JC, Mrksich M: **Protein nanoarrays generated by dip-pen nanolithography.** *Science* 2002, **295**: 1702-1705.
136. Breitenstein M, Holzel R, Bier FF: **Immobilization of different biomolecules by atomic force microscopy.** *J Nanobiotechnology* 2010, **8**: 10.
137. Ehricht R, Adelhelm K, Monecke S, Huelseweh B: **Application of protein arraytubes to bacteria, toxin, and biological warfare agent detection.** *Methods Mol Biol* 2009, **509**: 85-105.
138. Huelseweh B, Ehricht R, Marschall HJ: **A simple and rapid protein array based method for the simultaneous detection of biowarfare agents.** *Proteomics* 2006, **6**: 2972-2981.
139. Cretich M, di Carlo G, Longhi R, Gotti C, Spinella N, Coffa S *et al.*: **High sensitivity protein assays on microarray silicon slides.** *Anal Chem* 2009, **81**: 5197-5203.
140. Bavykin SG, Akowski JP, Zakhariev VM, Barsky VE, Perov AN, Mirzabekov AD: **Portable system for microbial sample preparation and oligonucleotide microarray analysis.** *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**: 922-928.
141. Yershov G, Barsky V, Belgovskiy A, Kirillov E, Kreindlin E, Ivanov I *et al.*: **DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**: 4913-4918.
142. Sevenet N, Cussenot O: **DNA microarrays in clinical practice: past, present, and future.** *Clin Exp Med* 2003, **3**: 1-3.
143. Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ: **High density synthetic oligonucleotide arrays.** *Nat Genet* 1999, **21**: 20-24.
144. Jayaraman A, Hall CK, Genzer J: **Computer simulation study of probe-target hybridization in model DNA microarrays: effect of probe surface density and target concentration.** *J Chem Phys* 2007, **127**: 144912.
145. Hoheisel JD: **Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis.** *Nat Rev Genet* 2006, **7**: 200-210.
146. Vente A, Korn B, Zehetner G, Poustka A, Lehrach H: **Distribution and early development of microarray technology in Europe.** *Nat Genet* 1999, **22**: 22.
147. Plomin R, Schalkwyk LC: **Microarrays.** *Dev Sci* 2007, **10**: 19-23.
148. Shoemaker DD, Linsley PS: **Recent developments in DNA microarrays.** *Curr Opin Microbiol* 2002, **5**: 334-337.
149. Heller MJ: **DNA microarray technology: devices, systems, and applications.** *Annu Rev Biomed Eng* 2002, **4**: 129-153.
150. Delehanty JB, Ligler FS: **Method for printing functional protein microarrays.** *Biotechniques* 2003, **34**: 380-385.

151. Shalon D, Smith SJ, Brown PO: **A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization.** *Genome Res* 1996, **6**: 639-645.
152. Schena M: **Genome analysis with gene expression microarrays.** *Bioessays* 1996, **18**: 427-431.
153. Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW: **Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**: 10614-10619.
154. Castellino AM: **When the chips are down.** *Genome Res* 1997, **7**: 943-946.
155. DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO: **Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale.** *Science* 1997, **278**: 680-686.
156. Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF *et al.*: **Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays.** *Nat Genet* 1999, **23**: 41-46.
157. Marshall A, Hodgson J: **DNA chips: an array of possibilities.** *Nat Biotechnol* 1998, **16**: 27-31.
158. Steel AB, Levicky RL, Herne TM, Tarlov MJ: **Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: effect of oligonucleotide length on layer assembly.** *Biophys J* 2000, **79**: 975-981.
159. Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R, Childs G: **Making and reading microarrays.** *Nat Genet* 1999, **21**: 15-19.
160. Stillman BA, Tonkinson JL: **Expression microarray hybridization kinetics depend on length of the immobilized DNA but are independent of immobilization substrate.** *Anal Biochem* 2001, **295**: 149-157.
161. Southern E, Mir K, Shchepinov M: **Molecular interactions on microarrays.** *Nat Genet* 1999, **21**: 5-9.
162. Khrapko KR, Lysov Y, Khorlyn AA, Shick VV, Florentiev VL, Mirzabekov AD: **An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing.** *FEBS Lett* 1989, **256**: 118-122.
163. Rubina AY, Pan'kov SV, Dementieva EI, Pen'kov DN, Butygin AV, Vasiliskov VA *et al.*: **Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production.** *Anal Biochem* 2004, **325**: 92-106.
164. Livshits MA, Mirzabekov AD: **Theoretical analysis of the kinetics of DNA hybridization with gel-immobilized oligonucleotides.** *Biophys J* 1996, **71**: 2795-2801.
165. Afanassiev V, Hanemann V, Wolfl S: **Preparation of DNA and protein micro arrays on glass slides coated with an agarose film.** *Nucleic Acids Res* 2000, **28**: E66.
166. Stillman BA, Tonkinson JL: **FAST slides: a novel surface for microarrays.** *Biotechniques* 2000, **29**: 630-635.

167. Sorokin NV, Chechetkin VR, Pan'kov SV, Somova OG, Livshits MA, Donnikov MY *et al.*: **Kinetics of hybridization on surface oligonucleotide microchips: theory, experiment, and comparison with hybridization on gel-based microchips.** *J Biomol Struct Dyn* 2006, **24**: 57-66.
168. Taylor S, Smith S, Windle B, Guiseppi-Elie A: **Impact of surface chemistry and blocking strategies on DNA microarrays.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**: e87.
169. Zammattéo N, Jeanmart L, Hamels S, Courtois S, Louette P, Hevesi L *et al.*: **Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays.** *Anal Biochem* 2000, **280**: 143-150.
170. Yauk CL, Berndt ML, Williams A, Douglas GR: **Comprehensive comparison of six microarray technologies.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**: e124.
171. Berthet N., Dickinson P., Filliol I., Kennedy G.C., *et al.*: **Massively parallel pathogen identification using high-density microarrays.** *Microbial Biotechnology* 2007, **1**: 79-86.
172. Yang YH, Buckley M, Dudoit S, Speed T: **Comparison of methods for image analysis on cDNA microarray data.** *Technical Report 584* 2000.
173. Latta D, Boucher C: **Microarray Gene Expression Profiling: The Basics.** *BioNote MG002 v1 0 BioRobotics Inc* 2000, Woburn, MA, USA.
174. Ramdas L, Cogdell DE, Jia JY, Taylor EE, Dunmire VR, Hu L *et al.*: **Improving signal intensities for genes with low-expression on oligonucleotide microarrays.** *BMC Genomics* 2004, **5**: 35.
175. Chou CC, Chen CH, Lee TT, Peck K: **Optimization of probe length and the number of probes per gene for optimal microarray analysis of gene expression.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**: e99.
176. Relogio A, Schwager C, Richter A, Ansorge W, Valcarcel J: **Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**: e51.
177. Suzuki S, Ono N, Furusawa C, Kashiwagi A, Yomo T: **Experimental optimization of probe length to increase the sequence specificity of high-density oligonucleotide microarrays.** *BMC Genomics* 2007, **8**: 373.
178. Tomiuk S, Hofmann K: **Microarray probe selection strategies.** *Brief Bioinform* 2001, **2**: 329-340.
179. He Z, Wu L, Li X, Fields MW, Zhou J: **Empirical establishment of oligonucleotide probe design criteria.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**: 3753-3760.
180. Wong CW, Heng CL, Wan YL, Soh SW, Kartasasmita CB, Simoes EA *et al.*: **Optimization and clinical validation of a pathogen detection microarray.** *Genome Biol* 2007, **8**: R93.
181. Dandy DS, Wu P, Grainger DW: **Array feature size influences nucleic acid surface capture in DNA microarrays.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**: 8223-8228.
182. Ekins RP, Chu FW: **Multianalyte microspot immunoassay--microanalytical "compact disk" of the future.** *Clin Chem* 1991, **37**: 1955-1967.

183. Shchepinov MS, Case-Green SC, Southern EM: **Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**: 1155-1161.
184. Wick LM, Rouillard JM, Whittam TS, Gulari E, Tiedje JM, Hashsham SA: **On-chip non-equilibrium dissociation curves and dissociation rate constants as methods to assess specificity of oligonucleotide probes.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**: e26.
185. Fotin AV, Drobyshev AL, Proudnikov DY, Perov AN, Mirzabekov AD: **Parallel thermodynamic analysis of duplexes on oligodeoxyribonucleotide microchips.** *Nucleic Acids Res* 1998, **26**: 1515-1521.
186. Naef F, Lim DA, Patil N, Magnasco M: **DNA hybridization to mismatched templates: a chip study.** *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2002, **65**: 040902.
187. Naef F, Magnasco MO: **Solving the riddle of the bright mismatches: labeling and effective binding in oligonucleotide arrays.** *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2003, **68**: 011906.
188. Zhang L, Miles MF, Aldape KD: **A model of molecular interactions on short oligonucleotide microarrays.** *Nat Biotechnol* 2003, **21**: 818-821.
189. Kane MD, Jatkoe TA, Stumpf CR, Lu J, Thomas JD, Madore SJ: **Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays.** *Nucleic Acids Res* 2000, **28**: 4552-4557.
190. Letowski J, Brousseau R, Masson L: **Designing better probes: effect of probe size, mismatch position and number on hybridization in DNA oligonucleotide microarrays.** *J Microbiol Methods* 2004, **57**: 269-278.
191. Mantripragada KK, Buckley PG, de Stahl TD, Dumanski JP: **Genomic microarrays in the spotlight.** *Trends Genet* 2004, **20**: 87-94.
192. Rennie C, Noyes HA, Kemp SJ, Hulme H, Brass A, Hoyle DC: **Strong position-dependent effects of sequence mismatches on signal ratios measured using long oligonucleotide microarrays.** *BMC Genomics* 2008, **9**: 317.
193. Kreil DP, Russell RR, Russell S: **Microarray oligonucleotide probes.** *Methods Enzymol* 2006, **410**: 73-98.
194. Fish DJ, Horne MT, Searles RP, Brewood GP, Benight AS: **Multiplex SNP discrimination.** *Biophys J* 2007, **92**: L89-L91.
195. Peterson AW, Heaton RJ, Georgiadis RM: **The effect of surface probe density on DNA hybridization.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**: 5163-5168.
196. Urakawa H, El Fantroussi S, Smidt H, Smoot JC, Tribou EH, Kelly JJ *et al.*: **Optimization of single-base-pair mismatch discrimination in oligonucleotide microarrays.** *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**: 2848-2856.
197. Sakallah S, Bolton D, MacRae SA: **RNA isolated from Mosquito Pools inhibits West Nile Virus real time RT-PCR: a case study using the smart cycler.** *New Hampshire Department of Health & Human Services, Public Health Laboratories, Concord, NH* 2002.

198. Drosten C, Gottig S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H *et al.*: **Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**: 2323-2330.
199. Kaerber G.: *Arch Exp Pathol Pharmacol* 1931, **162**: 480-483.
200. Spearman C.: *Brit J Psychol* 1908, **2**: 227-242.
201. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986, **51 Pt 1**: 263-273.
202. Brock TD, Freeze H: **Thermus aquaticus gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile.** *J Bacteriol* 1969, **98**: 289-297.
203. Diehl F, Grahlmann S, Beier M, Hoheisel JD: **Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**: E38.
204. Roux KH: **Optimization and troubleshooting in PCR.** *PCR Methods Appl* 1995, **4**: S185-S194.
205. Owczarzy R, Moreira BG, You Y, Behlke MA, Walder JA: **Predicting stability of DNA duplexes in solutions containing magnesium and monovalent cations.** *Biochemistry* 2008, **47**: 5336-5353.
206. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: **Molecular Cloning - A laboratory Manual**, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2010.
207. Lang G: **Histotechnik - Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik**, 1st edn. Wien: Springer; 2010.
208. Case-Green SC, Southern EM: **Studies on the base pairing properties of deoxyinosine by solid phase hybridisation to oligonucleotides.** *Nucleic Acids Res* 1994, **22**: 131-136.
209. Peytavi R, Liu-Ying T, Raymond FR, Boissinot K, Bissonnette L, Boissinot M *et al.*: **Correlation between microarray DNA hybridization efficiency and the position of short capture probe on the target nucleic acid.** *Biotechniques* 2005, **39**: 89-96.
210. Baldocchi RA, Glynn RJ, Chin K, Kowbel D, Collins C, Mack DH *et al.*: **Design considerations for array CGH to oligonucleotide arrays.** *Cytometry A* 2005, **67**: 129-136.

8 Anhang

8.1 Array-Layouts

8.1.1 Protein-Arrays

o	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	o
o	1	5	5	4	4	3	3				1	
	1	9	9	8	8	7	7	2	2	1	o	
	1	25	25	12	12	11	11	6	6	1	o	
o	1	22	22	23	23	24	24	21	21	1		
o	1	18	18	19	19	20	20	17	17	1		
o	1	14	14	15	15	16	16	13	13	1		
	1	10	10	11	11	12	12	9	9	1	o	
	1	6	6	7	7	8	8	5	5	1	o	
o	1	2	2	3	3	4	4			1		
o	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	o

Nr.	Code	Antigen
1	Puffer	
2	S100	SEB
3	S12	SEB
4	R2	Ricin
5	AF	Ricin
6	R2	Ricin
7	B12	Botulinum Neurotoxin A
8	B100	Botulinum Neurotoxin A
9	E1	<i>E. coli</i>
10	O100	OPV
11	O100/O101	OPV
12	F100	Flaviviren
13	O102.1	OPV
14	O103.1	OPV
15	O102.2	OPV
16	O103.2	OPV
17	O104	OPV
18	P100	PIXV
19	V100	VEEV
20	V101	VEEV
21	V102	VEEV
22	V-Mix	VEEV, WEEV, EEEV, CHIKV
23	V103	WEEV
24	V104	VEEV
25	V105	VEEV

Abbildung 53: Array Layout WIS-Chip 14 AP® (ID-Nr. 0722801 bzw. 0722802)

Die gelb unterlegten Spots stellen Fänger-Antikörper für Toxine und die hellblau unterlegten für Viren dar. Die grün gekennzeichneten Spots zeigen die Fänger-Antikörper für die Positivkontrolle.

Die mittelblauen asymmetrischen Marker-Spots am linken und rechten Rand dienen zur Orientierung der PocLab2-Software für das automatische Alignment. Es handelt sich dabei um 2 µM Cy5-markierte Oligonukleotide mit einer Länge von 20 Basenpaaren.

o	5	5	4	4	3	3			o
o	9	9	8	8	7	7	2	2	
	25	25	12	12	11	11	6	6	o
	22	22	23	23	24	24	21	21	o
o	18	18	19	19	20	20	17	17	
	14	14	15	15	16	16	13	13	o
	10	10	11	11	12	12	9	9	o
o	6	6	7	7	8	8	5	5	
o	2	2	3	3	4	4			o

Nr.	Code	Antigen
2		PBS
3	S12	SEB
4	R2	Ricin
5	AF	Ricin
6	R2	Ricin
7	B12	Botulinum Neurotoxin A
8	B100	Botulinum Neurotoxin A
9	E1	<i>E. coli</i>
10	O100	OPV
11	O100/O101	OPV
12	F100	Flaviviren
13		entfällt
14		entfällt
15	O102	OPV
16	O103	OPV
17		entfällt
18	P100	PIXV
19	V100	VEEV
20	V101	VEEV
21	V102	VEEV
22	V-Mix	VEEV, WEEV, EEEV, CHIKV
23	V103	WEEV
24	V104	VEEV

Abbildung 54: Array Layout WIS-Chip 15 AP® (ID-Nr. 0800901 bzw. 0800902)

Die gelb unterlegten Spots kennzeichnen Fänger-Antikörper für Toxine und die hellblau unterlegten für Viren, die auf den Biochip gespottet wurden. Die grün gekennzeichneten Spots zeigen die Fänger-Antikörper für die Positivkontrolle.

Die mittelblauen asymmetrischen Marker-Spots am linken und rechten Rand dienen zur Orientierung der Software für das automatische Alignment. Es handelt sich hierbei um 4 µM Cy5-markierte Oligonukleotide mit einer Länge von 20 Basenpaaren.

o	5	5	4	4	3	3	2	2	o
o	7	7					6	6	
	8	8	11	11	9	9	12	12	o
	10	10	13	13	14	14	15	15	o
o	16	16	17	17	18	18	14	14	
	15	15	16	16	17	17	18	18	o
	19	19	22	22	20	20	23	23	o
o	21	21	24	24	6	6	7	7	
o	2	2	3	3	4	4	5	5	o

Nr.	Code	Antigen
2	S12	SEB
3	R2	Ricin
4	R2-Z	Ricin
5	R2-BSA	Ricin
6	AF	Ricin
7	E1	<i>E. coli</i>
8	O100	OPV
9	O100-Z	OPV
10	O100-BSA	OPV
11	O100/O101	OPV
12	O100/O101-Z	OPV
13	O100/O101-BSA	OPV
14	F100	Flaviviren
15	F101	Denguevirus 4
16	F102	Denguevirus 1
17	F104	Denguevirus 3
18	F105	Dengueviren
19	V100	VEEV
20	V100-Z	VEEV
21	V100-BSA	VEEV
22	V-Mix	VEEV, WEEV, EEEV, CHIKV
23	V-Mix-Z	VEEV, WEEV, EEEV, CHIKV
24	V-Mix-BSA	VEEV, WEEV, EEEV, CHIKV

Abbildung 55: Array Layout WIS-Chip 16 AP® (ID-Nr. 0810801)

Die gelb markierten Spots kennzeichnen Fänger-Antikörper für Toxine und die hellblau unterlegten für Viren, die auf den Biochip gespottet wurden. Die grün gekennzeichneten Spots zeigen die Fänger-Antikörper für die Positivkontrolle.

Für die automatische Orientierung der Software zum Abgleich des Layouts wurden am linken und am rechten Rand asymmetrisch Marker-Spots positioniert. Es handelt sich hierbei um 4 µM Cy5-markierte Oligonukleotide mit einer Länge von 20 Basenpaaren.

8.1.2 DNA-Arrays

o	1	1	2	2	3	3	33	33	34	34	o
	4	4	5	5	6	6	35	35			o
	7	7	8	8	9	9	32	31	30	29	o
o	10	10	11	11	12	12	28	27	26	25	
o	13	13	14	14	15	15	24	23	22	21	
o	16	16	17	17	18	18	20	19	18	17	
o	19	19	20	20	21	21	16	15	14	13	
o	22	22	23	23	24	24	12	11	10	9	
	25	25			26	26	8	7	6	5	o
	27	27	28	28	29	29	4	3	2	1	o
o	30	30	31	31	32	32		35	34	33	o

Nr.	Code	spezifisch für
1	E1_V1	VEEV Stamm V198 (IC)
2	E1_V2	VEEV Stamm 3880 (ID)
3	E1_cons_iab_ic_id	Consensus VEEV
4	E1_V3	VEEV Stamm TC-83 (IAB)
5	E1_V4	VEEV Stamm SH3 (IC)
6	E1_W1	WEEV Stamm CBA87
7	E1_W2	WEEV Stamm McMillan
8	E1_W3	WEEV Stamm Fleming
9	E1_W4	WEEV Stamm 71V-1658
10	E1_cons_weev	Consensus WEEV
11	E1_W5	WEEV Stamm Mn520
12	E1_W6	WEEV Stamm B11
13	E2_V5	VEEV Stamm Trinidad (IAB)
14	E2_V3	VEEV Stamm TC-83 (IAB)
15	E2_V6	VEEV Stamm 8131 (ID)
16	E2_cons_ia_ic_id	Consensus VEEV
17	E2_V2	VEEV Stamm 3880 (ID)
18	E2_V7	VEEV Stamm 243937 (IC)
19	E2_V1	VEEV Stamm V198 (IC)
20	E2_W7	WEEV Stamm Mn 548
21	E2_W4	WEEV Stamm 71V-1658
22	E2_cons_weev	Consensus WEEV
23	E2_W3	WEEV Stamm Fleming
24	E2_W8	WEEV Stamm California
25	E2_W2	WEEV Stamm McMillan
26	Pox_F1	OPV
27	Pox_F2	OPV
28	Pox_F3	OPV
29	Pox_F4	OPV
30	Pox_F5	OPV
31	Pox_F6	OPV
32	Pox_F7	OPV
33	YFP_neu	YFV
34	YFV_5'UTR_V1	YFV
35	YFV_5'UTR_V2	YFV

Abbildung 56: Array Layout WIS-Chip 17 AP® (ID-Nr. 0813701)

Die gelb und orange unterlegten Spots kennzeichnen Fängersonden für das E1-Protein der Alphaviren. Dabei stellen die mit „V“ im Code beschrifteten Sonden (gelb) spezifische Fänger für VEEV dar, wohingegen die mit „W“ gekennzeichneten Sonden (gelb-orange) für WEEV-spezifische Fänger stehen. Das gleiche gilt für die grün unterlegten Spots, welche Fängersonden für das E2-Protein der Alphaviren verkörpern (hellgrün: VEEV-spezifisch, grün: WEEV-spezifisch). Die flügel- bzw. apricot-farbenen hervorgehobenen Spots kennzeichnen Fängersonden für Orthopockenviren beziehungsweise für das Gelbfieber-Virus.

Die mittelblauen asymmetrisch angeordneten Marker-Spots am linken und rechten Rand dienen zur Orientierung der Software für das automatische Alignment. Es handelt sich hierbei um 20 bp lange Cy5-markierte Oligonukleotide in einer Konzentration von 16,7 µM.

o	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	o
	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10	o
	11	11	12	12	13	13	14	14	15	15	o
o	16	16	17	17	18	18					
o	19	19	20	20	21	21	22	22	23	23	
o	24	24	25	25	26	26	27	27	28	28	
o	29	29	30	30	31	31	32	32	33	33	
o	34	34	35	35			36	36	37	37	
	38	38	39	39	40	40	41	41	42	42	o
					43	43	44	44	45	45	o
o	46	46	47	47	48	48	49	49	50	50	o

Abbildung 57: Array Layout WIS-Chip 18 AP® (ID-Nr. 0825501, 0827401 bzw. 0904701)

Die gelb und orange unterlegten Spots kennzeichnen Fängersonden für das E1-Protein der Alphaviren. Dabei stellen die mit „V“ im Code beschrifteten Sonden (gelb) spezifische Fänger für VEEV dar, wohingegen mit „W“ gekennzeichnete Sonden (gelb-orange) für WEEV-spezifische und die orange-farbenen Sonden für EEEV-spezifische Fänger-Oligonukleotide stehen. Das gleiche gilt für die grün unterlegten Spots, welche Fängersonden für das E2-Protein der Alphaviren verkörpern (hellgrün: VEEV-, grün: WEEV- und dunkelgrün: EEEV-spezifisch). Die flückerfarbenen hervorgehobenen Spots kennzeichnen Fängersonden für Orthopockenviren. Die Flavivirus-spezifischen Sonden sind apricotfarben (Gelbfieber-Virus) und hellblau (West-Nil-Virus) gekennzeichnet.

Die mittelblauen asymmetrisch angeordneten Marker-Spots am linken und rechten Rand dienen zur Orientierung der Software für das automatische Alignment. Es handelt sich hierbei um 20 bp lange Cy5-markierte Oligonukleotide in einer Konzentration von 16,7 µM.

Nr.	Code	spezifisch für
1	E1_V1	VEEV Stamm V198 (IC)
2	E1_V2	VEEV Stamm 3880 (ID)
3	E1_cons_iab_ic_id	Consensus VEEV
4	E1_V3_1	VEEV Stamm TC-83 (IAB)
5	E1_V4	VEEV Stamm SH3 (IC)
6	E1_V3_2	VEEV Stamm TC-83 (IAB)
7	E1_W1	WEEV Stamm CBA87
8	E1_W2	WEEV Stamm McMillan
9	E1_W3	WEEV Stamm Fleming
10	E1_W4	WEEV Stamm 71V-1658
11	E1_cons_weev	Consensus WEEV
12	E1_W5	WEEV Stamm Mn520
13	E1_W6	WEEV Stamm B11
14	EEEEV_F1	EEEEV
15	EEEEV_F2	EEEEV
16	EEEEV_F3	EEEEV
17	EEEEV_F4	EEEEV
18	EEEEV_F5	EEEEV
19	E2_V5	VEEV Stamm Trinidad (IAB)
20	E2_V3	VEEV Stamm TC-83 (IAB)
21	E2_V6	VEEV Stamm 8131 (ID)
22	E2_cons_ia_ic_id	Consensus VEEV
23	E2_V2	VEEV Stamm 3880 (ID)
24	E2_V7	VEEV Stamm 243937 (IC)
25	E2_V1	VEEV Stamm V198 (IC)
26	E2_W7	WEEV Stamm Mn 548
27	E2_W4	WEEV Stamm 71V-1658
28	E2_cons_weev	Consensus WEEV
29	E2_W3	WEEV Stamm Fleming
30	E2_W8	WEEV Stamm California
31	E2_W2	WEEV Stamm McMillan
32	EEEEV_F6	EEEEV
33	EEEEV_F7	EEEEV
34	EEEEV_F8	EEEEV
35	EEEEV_F9	EEEEV
36	Pox_F1	OPV
37	Pox_F2	OPV
38	Pox_F3	OPV
39	Pox_F4	OPV
40	Pox_F5	OPV
41	Pox_F6	OPV
42	Pox_F7	OPV
43	YFP_neu	YFV
44	YFV_5'UTR_V1	YFV
45	YFV_5'UTR_V2	YFV
46	WNV_F1	WNV
47	WNV_F2	WNV
48	WNV_F3	WNV
49	WNV_F4	WNV
50	WNV_F5	WNV

o	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	o
			7	7	8	8	9	9	10	10	o
	11	11	12	12	13	13	14	14	15	15	o
o											
o			20	20			22	22	23	23	
o	24	24	25	25			27	27	28	28	
o	29	29	30	30							
o	34	34	35	35			36	36			
					40	40	41	41	42	42	o
					43	43	44	44	45	45	o
o	46	46	47	47	48	48	49	49	50	50	o

Nr.	Code	spezifisch für
1	E1_V1	VEEV Stamm V198 (IC)
2	E1_V2	VEEV Stamm 3880 (ID)
3	E1_cons_iab_ic_id	Consensus VEEV
4	E1_V3_1	VEEV Stamm TC-83 (IAB)
5	E1_V4	VEEV Stamm SH3 (IC)
7	E1_cons_iab_ic_id_n1	Consensus VEEV
8	E1_cons_iab_ic_id_n2	Consensus VEEV
9	E1_W3	WEEV Stamm Fleming
10	E1_cons_iab_ic_id_n3	Consensus VEEV
11	E1_cons_weev	Consensus WEEV
12	E1_cons_weev_n1	Consensus WEEV
13	E1_cons_weev_n2	Consensus WEEV
14	EEEV_F1	EEEV
15	EEEV_F2	EEEV
20	E2_V3	VEEV Stamm TC-83 (IAB)
22	E2_cons_iab_ic_id	Consensus VEEV
23	E2_V2	VEEV Stamm 3880 (ID)
24	E2_cons_iab_ic_id_n1	Consensus VEEV
25	E2_cons_iab_ic_id_n2	Consensus VEEV
27	E2_cons_weev_n1	Consensus WEEV
28	E2_cons_weev	Consensus WEEV
29	E2_W3	WEEV Stamm Fleming
30	E2_W8	WEEV Stamm California
34	EEEV_F8	EEEV
35	EEEV_F9	EEEV
36	Pox_F1	OPV
40	Pox_F5	OPV
41	Pox_F6	OPV
42	Pox_F7	OPV
43	YFP_neu	YFV
44	YFP_neu2	YFV
45	YFP_neu3	YFV
46	WNV_F6	WNV
47	WNV_F7	WNV
48	WNV_F3	WNV
49	WNV_F8	WNV
50	WNV_F5	WNV

Abbildung 58: Array Layout WIS-Chip 19 AP® (ID-Nr. 0920201)

Die farbliche Codierung entspricht genau jener von WIS-Chip 18 AP® (Abbildung 57). Bei der Planung dieses Layouts wurden Sonden, welche auf dem WIS-Chip 18 AP® nur unzureichende Signale zeigten, nicht mehr berücksichtigt. Für Nachweisen, welche bisher nicht mit optimalen Signalintensitäten durchführbar waren, wurden neue Sonden konzipiert. Sonden, die identisch mit denen auf WIS-Chip 18 AP® sind, wurden auf derselben Position wie auf dem vorherigen Nukleinsäure-AP® zur besseren Orientierung gespotet.

Die mittelblauen asymmetrisch angeordneten Marker-Spots am linken und rechten Rand dienen zur Orientierung der Software für das automatische Alignment. Es handelt sich hierbei um 20 bp lange Cy5-markierte Oligonukleotide in einer Konzentration von 16,7 µM.

o	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	o
	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10	o
	11	11	12	12	13	13	14	14	15	15	o
o											
o			20	20	21	21	22	22	23	23	
o	24	24	25	25					28	28	
o	29	29	30	30	31	31					
o	34	34	35	35			36	36			
					40	40	41	41	42	42	o
					43	43	44	44			o
o			47	47	48	48	47	47	50	50	o

Nr.	Code	spezifisch für
1	E1_V1	VEEV Stamm V198 (IC)
2	E1_V2	VEEV Stamm 3880 (ID)
3	E1_cons_iab_ic_id	Consensus VEEV
4	E1_V3_1	VEEV Stamm TC-83 (IAB)
5	E1_V4	VEEV Stamm SH3 (IC)
6	cons_veev_ic_E1	Consensus VEEV
7	cons_veev_id_E1	Consensus VEEV
8	E1_cons_iab_ic_id_n3	Consensus VEEV
9	E1_W3	WEEV Stamm Fleming
10	cons_weev_E1_n3	Consensus WEEV
11	E1_cons_weev	Consensus WEEV
12	E1_cons_weev_n1	Consensus WEEV
13	cons_weev_E1_n4	Consensus WEEV
14	EEEEV_F1	EEEEV
15	EEEEV_F2	EEEEV
20	E2_V3	VEEV Stamm TC-83 (IAB)
21	cons_veev_iab_E2	Consensus VEEV
22	E2_cons_iab_ic_id	Consensus VEEV
23	E2_V2	VEEV Stamm 3880 (ID)
24	cons_veev_iab_ic_id_E2	Consensus VEEV
25	E2_cons_iab_ic_id_n2	Consensus VEEV
28	E2_cons_weev	Consensus WEEV
29	E2_W3	WEEV Stamm Fleming
30	E2_W8	WEEV Stamm California
31	cons_weev_E2_n2	Consensus WEEV
34	EEEEV_F8	EEEEV
35	EEEEV_F9	EEEEV
36	Pox_F1	OPV
40	Pox_F5	OPV
41	Pox_F6	OPV
42	Pox_F7	OPV
43	YFP_neu	YFV
44	YFP_neu2	YFV
47	WNV_F7	WNV
48	WNV_F3	WNV
49	WNV_F9	WNV
50	WNV_F5	WNV

Abbildung 59: Array Layout WIS-Chip 21 AP[®] (ID-Nr. 0928101 und 1002601)

Die farbliche Codierung entspricht genau jener von WIS-Chip 18 AP[®] und WIS-Chip 19 AP[®] (Abbildung 57 und Abbildung 58). Bei der Planung dieses Layouts wurden Sonden, welche auf dem WIS-Chip 18 und 19 AP[®] nur unzureichende bzw. unspezifische Signale zeigten, nicht mehr berücksichtigt. Für Nachweisen, welche bisher nicht mit optimalen Signalintensitäten durchführbar waren, wurden neue Sonden konzipiert. Sonden, die identisch mit denen auf WIS-Chip 18 AP[®] sind, wurden auf derselben Position wie auf dem vorherigen Nukleinsäure-AP[®] zur besseren Orientierung gespottet.

Die mittelblauen asymmetrisch angeordneten Marker-Spots am linken und rechten Rand dienen zur Orientierung der Software für das automatische Alignment. Es handelt sich hierbei um 20 bp lange Cy5-markierte Oligonukleotide in einer Konzentration von 10 µM.

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Struktur, Morphologie und Aufbau des Genoms von Togaviren	10
Abbildung 2:	Struktur, Morphologie und Aufbau des Genoms von Flaviviren	14
Abbildung 3:	Struktur, Morphologie und Aufbau des Genoms von Pockenviren.....	16
Abbildung 4:	Übersicht über die funktionellen Komponenten des AP-Systems	42
Abbildung 5:	Modell der Bildauslesung der AP [®] -Kartusche	44
Abbildung 6:	Schematische Darstellung eines immunologischen Antigen-Nachweises im AP [®] -System	55
Abbildung 7:	Schematische Beschreibung des AP [®] -Detektionsprinzips für ein Nukleinsäure-Array	60
Abbildung 8:	Einfluss der Antikörpermarkierung auf die Signalintensität	66
Abbildung 9:	Einfluss des molaren Kopplungsverhältnisses auf die Signalintensität.....	67
Abbildung 10:	Vergleich der Homogenität der Antigenbindung mit dem REM und in der AP [®] -Analyse	68
Abbildung 11:	Vergleich des Effektes auslaufender Spots mit dem REM und in der AP [®] -Analyse	69
Abbildung 12:	Titration von VEEV TC-83	71
Abbildung 13:	Immunologischer Nachweis verschiedener Alphaviren	72
Abbildung 14:	Titration des Vaccinia-Virus	73
Abbildung 15:	Titration der Positivkontrolle <i>E.coli</i>	74
Abbildung 16:	Titration von Reintoxin RCA60 und Rohtoxin RCA120	75
Abbildung 17:	Consensus-Sequenz des VEEV E1-Gens unter Berücksichtigung der in Tabelle 13 aufgeführten Vertreter der serologischen Gruppen IAB, IC und ID	79
Abbildung 18:	Consensus-Sequenz des VEEV E2-Gens unter Berücksichtigung der in Tabelle 13 aufgeführten Vertreter der serologischen Gruppen IAB, IC und ID	80
Abbildung 19:	Mit den spezifischen Primern im E1-Gen gebildetes Amplikon bei VEEV TC-83.....	81
Abbildung 20:	Mit den spezifischen Primern im E2-Gen gebildetes Amplikon bei VEEV TC-83.....	82
Abbildung 21:	Einfluss der Magnesiumchlorid-Konzentration auf die real-time RT- PCR-Signale und die gebildeten Amplikommengen im VEEV_E2- Nachweis	84
Abbildung 22:	Kontrolle der Amplikonlängen der RT-PCR- bzw. PCR-Produkte im Agarosegel.....	85
Abbildung 23:	Vergleich der gebildeten Amplikommengen im Laborgerät und in der AP [®] -Kartusche	87
Abbildung 24:	Hybridisierung in der AP [®] -Kartusche mit und ohne 5 x SSC-Puffer.....	88
Abbildung 25:	Einfluss der Erhöhung der Primerkonzentration auf die Signalintensität	90
Abbildung 26:	Einfluss der Extensionstemperatur auf die Signalintensität	91
Abbildung 27:	Einfluss der Hybridisierungszeit auf die Signalintensität	94
Abbildung 28:	Vergleich des Standard-RT-PCR-Protokolls mit dem verkürzten Prozessierungsprotokoll	95
Abbildung 29:	Das in der PCR gebildete Amplikon für den EEEV_E2-Nachweis	97
Abbildung 30:	Molekularbiologischer Nachweis von VEEV Stamm V198 und 3880.....	98
Abbildung 31:	Ausschnitt des VEEV_E2-Amplikons mit den Bindungsstellen der spezifischen Consensus-Sonden	98
Abbildung 32:	Das in der PCR gebildete Amplikon für den WEEV_E1-Nachweis mit den Bindungsstellen der spezifischen Consensus-Sonden	100
Abbildung 33:	Ausschnitt des WEEV_E2-Amplikons mit den Bindungsstellen der spezifischen Consensus-Sonden	101
Abbildung 34:	Nachweis und Titration von EEEV im E1- und E2-Gen.....	103
Abbildung 35:	Nachweis und Titration von VEEV im E1- und E2-Gen.....	104
Abbildung 36:	Nachweis und Titration von WEEV im E1- und E2-Gen.....	105
Abbildung 37:	Nachweis und Titration der Flaviviren WNV und YFV	106

Abbildung 38: Nachweis und Titration des DNA-Virus VacV.....	107
Abbildung 39: Stammspezifische VEEV-Fängersonden im VEEV_E1-Amplikon	109
Abbildung 40: Detektion und Identifikation verschiedener VEEV-Stämme	110
Abbildung 41: Parallelnachweis von EEEV im E1- und E1-Gen	111
Abbildung 42: Parallelnachweis von VEEV und WEEV im E1-Gen	112
Abbildung 43: Parallelnachweis von VEEV im E1- und von WEEV im E2-Gen	113
Abbildung 44: Parallelnachweis von VEEV im E1-Gen, WNV und YFV	114
Abbildung 45: Parallelnachweis von WNV, YFV und VacV.....	115
Abbildung 46: Parallelnachweis von WEEV im E1-Gen, YFV und VacV	116
Abbildung 47: Agarose-Gelelektrophorese spezifischer viraler Multiplex-Nachweise im Vergleich mit den Einzelnachweisen	117
Abbildung 48: Intra- und Interassay-spezifische Variabilität des molekularbiologischen Nachweises von VEEV im E1-Gen.....	118
Abbildung 49: Einfluss des Kartuschenalters auf die Signalintensitäten des molekularbiologischen VEEV_E1-Nachweises	119
Abbildung 50: Schematische Darstellung der theoretischen Bindungsereignisse bei einem molekularbiologischen Nachweis mit Oligonukleotidsonden im AP [®] -System	126
Abbildung 51: Endgültiges Array-Layout für die immunologische Identifikation von Ricin, Alpha- und Orthopockenviren.....	133
Abbildung 52: Endgültiges Array-Layout für die molekularbiologische Identifikation von Alpha-, Flavi- und Orthopockenviren	134
Abbildung 53: Array Layout WIS-Chip 14 AP [®] (ID-Nr. 0722801 bzw. 0722802).....	149
Abbildung 54: Array Layout WIS-Chip 15 AP [®] (ID-Nr. 0800901 bzw. 0800902).....	150
Abbildung 55: Array Layout WIS-Chip 16 AP [®] (ID-Nr. 0810801)	151
Abbildung 56: Array Layout WIS-Chip 17 AP [®] (ID-Nr. 0813701)	152
Abbildung 57: Array Layout WIS-Chip 18 AP [®] (ID-Nr. 0825501, 0827401 bzw. 0904701).....	153
Abbildung 58: Array Layout WIS-Chip 19 AP [®] (ID-Nr. 0920201)	154
Abbildung 59: Array Layout WIS-Chip 21 AP [®] (ID-Nr. 0928101 und 1002601)	155

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über die verschiedenen antigenen Komplexe des Genus Alphavirus [14,18,22,23]	8
Tabelle 2:	Klassifizierung des VEE-Komplexes [14,18,26,58,62-66]	12
Tabelle 3:	Übersicht über Bakterien, Viren und Toxine, welche potentielle biologische Kampfstoffe darstellen (Quelle: CDC)	19
Tabelle 4:	Geschichtliche Entwicklung der Microarrays	21
Tabelle 5:	Anwendungen für Microarrays	22
Tabelle 6:	Verwendete Fänger- und Nachweis-Antikörper und -Moleküle im AP [®] -System	35
Tabelle 7:	Bei der rt RT-PCR und rt PCR verwendete Primer und TaqMan-Sonden	37
Tabelle 8:	Für die DNA-Arrays etablierte Fängersonden	38
Tabelle 9:	Verwendete Zellen, ihre Charakteristika, Medien und Verwendung	45
Tabelle 10:	Verwendete Virusstämme für den immunologischen Nachweis inklusive Angaben über Inaktivierung und Titer	47
Tabelle 11:	Zu pipettierendes Volumen aus dem DyLight 649-Stock für theoretische Kopplungsverhältnisse zwischen Farbstoff und Antikörper	52
Tabelle 12:	Zusammenfassung der durchgeführten Sandwich-ELISA-Nachweise	54
Tabelle 13:	Für die Primer- und Sondenkonzeption berücksichtigte VEEV-Stämme	61
Tabelle 14:	Zusammensetzung der RT-PCR- bzw. PCR-Ansätze	62
Tabelle 15:	Standard-RT-PCR-Programm für den Nachweis von RNA-Viren	62
Tabelle 16:	Standard-PCR-Programm für den Nachweis von DNA-Viren	63
Tabelle 17:	Berechnung der theoretisch gebundenen Keime einer 1:100 verdünnten <i>E.coli</i> -Präparation an einen Biochip-Spot	70
Tabelle 18:	Parameter für den Entwurf der Consensus-Primer und Hybridisierungssonden	80
Tabelle 19:	In der RT-PCR bzw. PCR optimierte Magnesium- und Primerkonzentrationen für den Nachweis von DNA- und RNA-Viren	84
Tabelle 20:	Vergleich der Signalintensität der VEEV_E2-spezifischen Hybridisierungssonden	99
Tabelle 21:	Vergleich der Signalintensität der WEEV_E1-spezifischen Hybridisierungssonden	101
Tabelle 22:	Vergleich der Signalintensität der WEEV_E2-spezifischen Hybridisierungssonden	101
Tabelle 23:	Zusammenfassung der erzielten Nachweisgrenzen der Alpha-, Flavi- und Orthopockenvirus-Nachweise im AP [®] -System	108
Tabelle 24:	Vergleich der Detektionsgrenzen von ausgewählten B-Agenzien in immunologischen Assays	121
Tabelle 25:	Vergleich der Detektionsgrenzen von ausgewählten B-Agenzien in molekularbiologischen Assays	128

8.4 Danksagung

Mein herzlicher Dank für die Betreuung und die Übernahme der Mentorenschaft gilt Prof. Dr. Stefan Dübel vom Institut für Biotechnologie der Technischen Universität Braunschweig.

Herrn Prof. Dr. Dierstein danke ich für die Möglichkeit der Durchführung meiner praktischen Laborarbeit am Wehrwissenschaftlichen Institut für Schutztechnologien – ABC-Schutz.

Ich danke Dr. Birgit Hülseweh aus der Virologie für die uneingeschränkte Unterstützung sowohl im Labor als auch beim Anfertigen dieser Arbeit. Von ihr habe ich viel gelernt und sie hat einen immensen Anteil am Gelingen dieser Dissertation. Danke für den täglichen Ansporn, die konstruktiven Debatten, den Anspruch über den Tellerrand zu blicken und all die persönlichen Gespräche.

Luzie Voß, Claudia Langermann, Katrin Böhling und Michael von der Ohe danke ich herzlich für die Hilfe im Labor, die Bereitstellung der Viren und Antikörper und alle anderen Beiträgen für das praktische Gelingen meiner Arbeit und den vielen angenehmen fachlichen und nicht-fachlichen Gesprächen. Ohne Euch wäre ich nie so weit gekommen. Danke für die praktischen Ratschläge, die aufmunternden Worte und die vorbehaltlose Anteilnahme an meiner Arbeit.

Herrn Dr. Marschall gebührt mein Dank für die vielschichtigen und konstruktiven Diskussionen und die hilfreichen Anregungen für die praktischen Arbeiten. Mein Dank gilt des Weiteren Günter Straube für die Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Neben meiner Arbeitsgruppe in der Virologie trugen viele andere Kollegen des WIS zum Gelingen dieser Arbeit bei. Zu nennen sind insbesondere Frau Dr. Niederwöhrmeier für die Bereitstellung der bakteriellen Antigene und Antikörper, Gudrun Grote für die Hilfe bei der Sequenzierung und Jörn-Ulrich Heinrich für die Einführung in die instrumentelle Analytik.

Dank auch an Dr. Claudia Gluch der Zenteris GmbH für die zweieinhalb-jährige Finanzierung meiner Promotion. Dr. Yann Astier von der Neuen Universität Lissabon danke ich für die Möglichkeit meine Horizonte im Rahmen eines Marie-Curie-Stipendiums zu erweitern.

Meinen Eltern gilt mein ganz besonderer Dank für die jahrelange Unterstützung all meiner Träume und ihr reges Interesse über die gesamte Zeit meiner naturwissenschaftlichen Ausbildung. Dan Tomuzia danke ich für den Beistand, die Ermutigungen in jeglichen Lebenslagen, seinen Glauben an meine Fähigkeiten und seine bedingungslose Liebe. Danke für alles!